

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی قزوین

پایان نامه کارشناسی ارشد علوم تشریحی:

ارتباط پلی مورفیسم های ژنی گیرنده های استروژنی آلفا و بتا با سقط مکرر خودبه خودی در جمعیت زنان
ایرانی

اساتید راهنما

دکتر فرزاد رجایی

دکتر فرح ایده آلی

اساتید مشاور

دکتر محمود جدی تهرانی

دکتر سعید زارعی

نگارنده

مرضیه مهدوی پور

بهار ۹۲

تقدیر و تشکر:

سپاس خالق یگانه ای را که مرا توفیق دانش اندوزی عطا فرمود و یاریم کرد تا این راه را به پایان برسانم. از تمامی اساتید و بزرگوارانی که در تمامی سالهای تحصیل از محضر گرانقدرشان بهره برده ام تشکر می نمایم که از مولای یکتا پرستان به یاد مانده،

"هر آن کس که کلمه ای به من بیاموزد مرا بنده خویش ساخته است"

از اساتید گرامی سر کار خانم دکتر ایدالی و جناب آقای دکتر رجایی که در طی این پروژه از راهنمایی های ارزنده شان بسیار استفاده کرده ام نهایت تشکر را دارم.

به علاوه از جناب آقای دکتر تهرانی، مدیریت محترم پژوهشکده آنتی بادی مونوکلونال، جناب آقای دکتر صادقی، معاونت محترم پژوهشگاه ابن سینا و جناب آقای دکتر آخوندی، مدیریت محترم پژوهشگاه ابن سینا، و همچنین جناب آقای دکتر محمودی، مدیریت محترم گروه علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی قزوین نهایت تشکر را دارم.

همچنین از جناب آقایان دکتر حیدری، دکتر زارعی، دکتر شیرازی، جناب آقای لک پور و جناب آقای مقیمی که در طی این پروژه مشوق بنده بودند نهایت تشکر و سپاس را دارم.

جا دارد که از تمامی اساتید و همکاران و دوستان خوبم در پژوهشگاه ابن سینا و دانشگاه علوم پزشکی قزوین، خانم ها رامینا فاطمی، لیلا کاتوزیان، هاله عدالت خواه، شقایق امامی، المیرا آزادی و سرکار خانم اسکندری، تشکر می نمایم.

تقدیم به:

"دو ستاره ی زندگیم"

"پدر و مادر عزیزم"

دو عزیزی که آغوششان امن ترین جایگاه دنیاست و مطمئن ترین پناهگاه و مستحکم ترین تکیه گاه دوران زندگیم هستند. پدر و مادر عزیزم تا دنیا دنیاست به اندازه تمام هستی دوستتان دارم.

"دو برادر عزیزم"

همبازی و خاطره سازان تمامی خاطرات خوبم.

و تقدیم به

آنان که امروز را مدیون بودنشان هستیم.

فهرست مطالب:

فصل اول: مقدمه

چکیده:	ز
مقدمه	۲
۱-۱- تعریف مسئله	۲
۲-۱- ضرورت پژوهش	۳
۳-۱- اهداف پژوهش	۳
۴-۱- چارچوب انجام پژوهش	۴
۱-۴-۱- سقط مکرر	۴
۲-۴-۱- اتیولوژی	۶
۳-۴-۱- عوامل ژنتیکی	۶
۴-۴-۱- عوامل انعقادی	۷
۵-۴-۱- اختلالات آناتومیک	۸
۶-۴-۱- علل ایمنی	۸
۷-۴-۱- علل عفونی	۹
۸-۴-۱- اختلالات اندوکراین	۱۰
۹-۴-۱- عوامل دیگر	۱۱
۵-۱- سیستم اندوکراین	۱۴
۶-۱- هورمون	۱۵
۱-۶-۱- هورمون های استروئیدی	۱۶
۷-۱- استروژن ها	۱۹
۱-۷-۱- گیرنده های استروژنی	۲۱
۸-۱- مطالعات انجام گرفته بر روی نقش پلی مورفیسم گیرنده های استروژنی در سقط مکرر ...	۲۵

فصل دوم: مواد و روش ها

۱-۲- دستورالعمل ها	۲۸
۲-۲- استخراج DNA	۲۸

۲۹	۱-۲-۲- مواد، محلولهای لازم برای استخراج DNA:
۲۹	۲-۲-۲- تهیه محلول های مورد نیاز:
۳۰	۳-۲-۲- روش استخراج:
۳۲	۳-۲- الکتروفورز روی ژل آگارز:
۳۲	۱-۳-۲- مواد و وسایل مورد نیاز الکتروفورز:
۳۳	۲-۳-۲- تهیه بافر TAE (50X) (Running Buffer):
۳۳	۴-۲- آنالیز کمی و کیفی DNA:
۳۴	۱-۴-۲- آنالیز کیفی DNA:
۳۵	۲-۴-۲- آنالیز کمی DNA:
۳۶	۵-۲- ژنوتایپ کردن نمونهها (ژنوتایپینگ):
۳۶	۱-۵-۲- انتخاب پرایمرهای مناسب برای هر موتاسیون:
۳۶	۱-۱-۵-۲- طراحی آغازگر:
۳۷	۲-۱-۵-۲- مواقعی که پرایمرها مکمل DNA هدف (الگو) نباشند:
۳۷	۳-۱-۵-۲- دمای ذوب آغازگر:
۳۸	۴-۱-۵-۲- غلظت پرایمرها و روش اندازه گیری آن:
۴۱	۶-۲- واکنش زنجیرهای پلیمراز:
۴۴	۷-۲- مواد و تهیه ژل آگارز:
۴۴	۱-۷-۲- مواد و محلولهای لازم برای الکتروفورز ژل آگارز:
۴۵	۲-۷-۲- نحوه تهیه ژل آگارز ۱/۵٪:
۴۶	۸-۲- چندشکلی در طول قطعات محدود:
۴۸	۱-۸-۲- روش انجام RFLP بر روی محصولات PCR:
۴۸	۹-۲- روش های آماری مورد استفاده:

فصل سوم: نتایج

۵۰	۱-۳- بررسی کمی و کیفی DNA استخراج شده:
۵۲	۲-۳- انتخاب پرایمرهای مناسب:
۵۴	۳-۳- نتایج PCR:
۵۷	۴-۳- نتایج RFLP:

۵۸	۳-۴-۱- پلی مورفیسم های ژن گیرنده استروژن آلفا.....
۵۹	۳-۴-۱-۱- موتاسیون (C/T) rs2234693 در گیرنده استروژن آلفا.....
۶۰	۳-۴-۱-۲- موتاسیون (A/G) rs9340799 در گیرنده استروژن آلفا.....
۶۲	۳-۴-۲- پلی مورفیسم های ژن گیرنده استروژن بتا.....
۶۳	۳-۴-۲-۱- موتاسیون (C/T) rs1256030 در گیرنده استروژن بتا.....
۶۴	۳-۴-۲-۲- موتاسیون (G/A) rs4986938 در گیرنده استروژن بتا.....
۶۶	۳-۴-۲-۳- موتاسیون (G/A) rs1256049 در گیرنده استروژن بتا.....
۶۷	۳-۵- نتایج بررسی های آماری.....

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

۸۵	۴-۶- نتیجه گیری.....
۸۶	۴-۷- پیشنهادات.....
۸۷	References.....
۹۸	چکیده انگلیسی.....

فهرست جداول

- جدول ۱-۱: فراوانی عوامل سقط مکرر ۱۰
- جدول ۱-۲: توالی جفت پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش ۴۱
- جدول ۲-۲: برنامه PCR بهینه سازی شده برای هر جفت پرایمر ۴۴
- جدول ۱-۳: بررسی کمی DNA ۵۱
- جدول ۲-۲: توالی جفت پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش ۵۳
- جدول ۲-۳: جایگاه برش آنزیم های مورد استفاده ۵۳
- جدول ۳-۳: برنامه PCR بهینه سازی شده برای هر جفت پرایمر ۵۴
- جدول ۴-۳: مقایسه فرکانس ژنوتایپی موتاسیون (C/T) rs2234693 در گیرنده استروژن آلفا .. ۵۹
- جدول ۵-۳: مقایسه فرکانس و ژنوتایپی موتاسیون (A/G) rs9340799 در گیرنده استروژن آلفا ۶۱
- جدول ۶-۳: مقایسه فرکانس ژنوتایپی موتاسیون (C/T) rs1256030 در گیرنده استروژن بتا ۶۳
- جدول ۷-۳: مقایسه فرکانس ژنوتایپی موتاسیون (G/A) rs4986938 در گیرنده استروژن بتا .. ۶۵
- جدول ۸-۳: مقایسه فرکانس ژنوتایپی موتاسیون (G/A) rs1256049 در گیرنده استروژن بتا .. ۶۶
- جدول ۹-۳: بررسی فراوانی پلی مورفیسم های گیرنده های استروژن آلفا و بتا ۶۸
- جدول ۴-۱ - مقایسه فراوانی هاپلوتیپ ۷۷

شکل ۱-۱: غدد اندوکراین موجود در بدن.....	۱۴
شکل ۲-۱: سلول های دارای گیرنده های هورمون.....	۱۵
شکل ۳-۱: عملکرد هورمون های استروئیدی.....	۱۷
شکل ۴-۱: ساختمان گیرنده های هسته ای.....	۲۲
شکل ۵-۱: مکانیسم عملکرد ER.....	۲۳
شکل ۶-۱: ساختمان و هومولوژی دومین های $ER\alpha$ و $ER\beta$	۲۴
تصویر ۱-۲: الکتروفورز برای تعیین آنالیز کیفی DNA.....	۳۴
تصویر ۳-۲: استفاده از Primer-Blast(NCBI).....	۴۰
شکل ۴-۲: نحوه تکثیر DNA به روش PCR.....	۴۳
تصویر ۵-۲: مراحل تهیه ژل آگارز الکتروفورز.....	۴۵
شکل ۶-۲: نمایش مراحل بیوانفورماتیکی انتخاب آنزیم.....	۴۷
شکل ۱-۳: بررسی غلظت DNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفوتومتر (نانودراپ).....	۵۰
شکل ۲-۳: الکتروفورز نمونه های DNA بر روی ژل آگارز ۱٪.....	۵۳
شکل ۳-۳: الکتروفورز محصول PCR برای $ER\alpha$	۵۵
شکل ۴-۳: الکتروفورز محصول PCR برای $ER\beta$	۵۶
شکل ۵-۳: نتایج الکتروفورز پلی مورفیسم گیرنده استروژن آلفا.....	۵۸
شکل ۶-۳: نتایج الکتروفورز پلی مورفیسم گیرنده استروژن بتا:.....	۶۲
تصویر ۱-۴: جایگاه پلی مورفیسم های rs2234693 (C/T) و rs9340799 (A/G).....	۷۵
شکل ۲-۴: ساختار ژن ESR2.....	۸۴

چکیده:

مقدمه: سقط مکرر، یکی از شایع ترین رویدادهای پزشکی است، که در طول ۳ ماهه اول در ۵-۱٪ از بارداری ها رخ می دهد. سقط در سه یا بیشتر از سه دوره بارداری که تا قبل از هفته بیست اتفاق می افتد را سقط مکرر می نامند

مواد و روش ها: در این مطالعه، از نمونه خون، ۲۵۰ زن مبتلا به سقط مکرر خودبخودی (داشتن سابقه حداقل سه یا بیشتر) و همچنین ۱۰۵ خانم بدون سابقه سقط و دارای حداقل دو باروری موفق که به مرکز فوق تخصصی درمان ناباروری و سقط مکرر این سینا مراجعه کرده بودند، استفاده شد. با بکار بردن روش Salting out ، DNA از نمونه های خون محیطی استخراج شد. دو پلی مورفیسم از ژن $ER\alpha$ ، rs2234693 (C/T) و rs9340799 (A/G) و همچنین سه پلی مورفیسم از ژن $ER\beta$ ، rs1256030 (C/T)، rs4986938 (G/A)، rs1256049 (G/A) با روش PCR-RFLP بررسی شد.

نتایج: فراوانی های ژنوتیپی و آللی دو پلی مورفیسم $ER\alpha$ (rs2234693 (C/T) و rs9340799 (A/G)) و همچنین پلی مورفیسم های rs1256030 (C/T) و rs4986938 (G/A) از ژن $ER\beta$ هیچ تفاوت معنی داری را بین گروه بیمار و کنترل نشان نداد. در مقابل فراوانی ژنوتیپی در پلی مورفیسم rs1256049 (G/A) تفاوت معنی داری را بین بیماران و کنترل نشان داد و ژنوتیپ GA به طور معنی داری در گروه کنترل بالاتر از بیماران بود.

بحث: یافته های ما پیشنهاد می کند که پلی مورفیسم rs1256049 (G/A) ممکن است با استعداد ابتلا به RPL در جمعیت ایرانی مرتبط باشد و آلل G ممکن است نقشی حفاظتی را در بروز بیماری داشته باشد.

کلمات کلیدی: سقط مکرر ، گیرنده استروژن ، پلی مورفیسم ، PCR- RFLP

فصل اول

مقدمه

ازدواج مرحله مهمی از تشکیل خانواده است که بیش از همه مراسم و رویدادهای زندگی انسان در جنبه های متعدد فردی و زیستی و اجتماعی، امری جهانی و از نظر هدف ثابت و پایدار است. میل به داشتن فرزند و تدوام نسل از انگیزه ها و اهداف مهمی است که همواره در دوره های مختلف تاریخی موجب ازدواج و تشکیل خانواده شده است و هر گونه اختلال در این رابطه موجب غم و اندوه و مشکلات متعددی از جمله اقدام به طلاق می شود. از جمله این اختلالات می توان به سقط مکرر اشاره نمود.

۱-۱- تعریف مسئله

سقط مکرر، یکی از شایع ترین رویدادهای پزشکی است، که در طول ۳ ماهه اول در ۵-۱٪ از بارداری ها رخ می دهد. اساس ژنتیکی سقط مکرر به طور کامل شناخته نشده است، ولی بررسی های انجام شده نقش تعدادی از موتاسیون ها در ژن های مختلف، چند شکلی های این ژن ها و اختلالات سیتوژنیک را در ایجاد این سندرم نشان داده اند. ارتباط موتاسیون ژن های گیرنده های استروژن موضوع بسیار بحث بر انگیز در رابطه با سقط مکرر می باشد و نتایج حاصل از این مطالعات در جمعیت های مختلف، متفاوت می باشد. استروژن از انواع هورمون های استروئیدی می باشد و بسیاری از عملکردها را در ارتباط با تولید مثل را تنظیم می کند. به طور خلاصه این هورمون دارای نقش اساسی در رشد و تکامل رویان و جنین، صفات ثانویه جنسی، سیکل تولیدمثلی، باروری و تقویت حاملگی است. خارج کردن جسم زرد در مراحل اولیه حاملگی، باعث کاهش سطح سرمی استروژن و پروژسترون می شود که این امر منجر به سقط می گردد. این هورمون در طی دوران قبل از لانه گزینی رویان و در تمام دوران حاملگی مورد نیاز است. هرگونه اختلال در رابطه با استروژن منجر به از دست دادن جنین در مراحل مختلف تکاملی می شود.

استروژن تأثیرات خود را از طریق گیرنده هایش اعمال می کند. دو گروه اصلی از گیرنده های استروژنی در انسان موجود می باشد که بر روی دو کروموزوم متفاوت قرار دارند: $ER\alpha$ و $ER\beta$. هر گونه تغییر و اختلال در الگوی بیانی و ساختاری این گیرنده ها، می تواند اثرات فیزیولوژیک هورمون را تحت تأثیر قرار دهد.

در این پژوهش به بررسی موتاسیون های ژن های گیرنده های استروژن ($ER\alpha$ و $ER\beta$) شامل: $ER\alpha$ با دو موتاسیون rs2234693 (C/T) و rs9340799 (A/G)، $ER\beta$ با سه موتاسیون rs1256030 (C/T)، rs4986938 (G/A) و rs1256049 (G/A) پرداخته شده است.

۱-۲- ضرورت پژوهش

نظر به اینکه چنین مطالعه ای تا کنون در ایران انجام نشده است و از آنجایی که جمعیت مردم ایران از نظر ژنتیکی با جمعیت های دیگر متفاوت هستند، لذا نتایج حاصل از بررسی موتاسیون ژن های گیرنده استروژنی در ایران ممکن است با دیگر جوامع متفاوت باشد. در نتیجه این مطالعه می تواند تصویری از ترکیب ژنی مردم ایران در ارتباط با موتاسیون های مربوط به ژن های گیرنده استروژنی و ارتباط آن با سقط مکرر را نشان داده و کمک خواهد کرد تا تاثیر درمان استروژن در خانم های با مشکل سقط با نگرشی دیگر مورد بررسی قرار گیرد.

۱-۳- اهداف پژوهش

به طور کلی هدف از انجام هر پژوهش دستیابی به یک هدف اصلی و چندین هدف فرعی است در واقع اهداف فرعی مقدمه رسیدن به هدف اصلی است. هدف آرمانی این پژوهش بررسی ارتباط موتاسیون های ژنی گیرنده های استروژن به عنوان فاکتور خطر ژنتیکی با سندرم سقط مکرر می باشد. این طرح شامل بررسی ارتباط موتاسیون ها به طور جداگانه و همچنین بر هم کنش بین آن ها و سندرم سقط مکرر می باشد. ارتباط موتاسیون ها ی ژنی گیرنده های استروژن با سندرم سقط مکرر به عنوان فاکتور خطر ژنتیکی برای این سندرم، هر یک به طور جداگانه و نیز به صورت هتروزیگوس مرکب بررسی می شود. یکی از اهداف فرعی این پژوهش محاسبه خطر ابتلا به سندرم سقط مکرر در افراد دارای موتاسیون های ژنی گیرنده های استروژن می باشد.

۱-۴- چارچوب انجام پژوهش

۱-۴-۱- سقط مکرر

سازمان بهداشت جهانی (WHO^۱) سقط را از دست دادن جنین یا رویان تا وزن ۱۵۰ گرم، پیش از هفته ۲۲ بارداری تعریف می کند. سقط یک اتفاق متداول در طی دوران بارداری است و این یکی از مشکلاتی است که همسران جوان با آن روبرو هستند، که باعث نگرانی و ناکامی آنها می شود. در واقع حدود ۱۵٪ بارداری هایی که از نظر کلینیکی تشخیص داده می شوند، در نیمه اول بارداری سقط می شوند (۱).

سقط شامل انواع مختلف است:

- ۱- سقط ناقص: سقطی است که محتویات رحمی به طور کامل تخلیه نشود.
- ۲- سقط فراموش شده^۲: زمانی رخ می دهد که ۶-۸ هفته از مرگ جنین در رحم گذشته باشد.
- ۳- سقط کامل^۳: سقطی است که محتویات رحمی به طور کامل تخلیه شود.
- ۴- سقط مکرر خودبه خودی^۴: هنگامی که سه سقط پی در پی و بدون دخالت و تاثیر دارو یا وسایل مکانیکی صورت گیرد.
- ۵- سقط عمد^۵ (۲).

سقط مکرر (Recurrent Pregnancy Loss; RPL) در منابع مختلف تعاریف متفاوتی دارد. سقط مکرر واژه ایست که در قدیم به عمل از دست دادن جنین در سه یا بیشتر از سه دوره بارداری و قبل از هفته ۲۴ اتلاق می شد (۳). اما امروزه تعریف مدرن تری برای این واژه مطرح شده است. در تعریف مدرن سقط در دو یا بیشتر از دو دوره بارداری که تا قبل از هفته بیست اتفاق می افتد را سقط مکرر می نامند (۴، ۵). سقط مکرر، از دست دادن حاملگی داخل رحمی بدون دخالت عوامل خارجی می باشد. کالام و همکارانش در مطالعه ای بیان کردند که ۵٪ زوج ها، دو سقط مکرر و ۲٪ آن ها سه سقط مکرر یا

^۱ - Word Health Organization

^۲ - Missed Abortion

^۳ - Complete Abortion

^۴ - Recurrent Pregnancy Loss(RPL)

^۵ - Induced Abortion

بیشتر را تجربه خواهند کرد. این سقط از شایع ترین عارضه ی حاملگی محسوب می شود و موجب استرس شدید در زوج های مشتاق می شود.

سقط مکرر به دو گروه سقط مکرر اولیه و ثانویه تفکیک می گردد. در سقط اولیه فرزند زنده ای متولد نمی شود، ولی در سقط مکرر ثانویه یک یا چند تولد زنده و پس از آن سقط های پشت سر هم رخ می دهد (۲).

مطالعات انجام شده بیان می کند که سه سقط پشت سر هم ریسک RPL خود به خودی را در حاملگی های بعدی ۷۳-۸۴٪ افزایش می دهد. به طور کلی زنانی که حاملگی اول آن ها موفقیت آمیز بوده است، ریسک سقط بعدی به طور نسبی پایین و حدود ۴-۶٪ است. اما در زنانی که حاملگی آخر آنها سقط شده است، احتمال سقط بعدی بیشتر و حدود ۱۹-۲۴٪ است. بطور کلی ریسک سقط، بعد از ۴ سقط گذشته کمتر از ۴۰٪ بوده و این ریسک حتی در افرادی با سابقه ۶ سقط و یا بیشتر نیز، بیشتر از ۵۰٪ نمی باشد. همچنین این ریسک با افزایش سن بیشتر می شود، بطوریکه در سنین زیر ۳۰ سال ۷-۱۵٪، ۳۰ تا ۴۰ سال ۸-۲۱٪، سنین ۳۵-۳۹ سال ۱۷-۲۸٪، و بعد از ۴۰ سالگی حدود ۵۲-۳۴٪ می باشد (۶).

سقط مکرر خودبه خودی (RPL) به عنوان یک سندرم یا بیماری چند عاملی^۱ شناخته شده است (۷)، که در نیمی از موارد علت آن ناشناخته باقی مانده است. اما بررسی های سیتوژنتیکی نمونه های سقط نشان داده است، که در ۵۰٪ موارد رویان یا جنین های سقط شده از نظر سیتوژنتیکی غیر طبیعی بودند (۸). در RPL اولیه ۵۵٪ سقط شده ها و در RPL ثانویه ۳۵٪ آن ها از نظر سیتوژنتیکی غیر طبیعی بودند. اساس ژنتیکی سقط مکرر خودبه خودی جنین به طور ناچیزی شناخته شده است. موتاسیون های ژن های منفرد، پلی ژنیک و فاکتور های سیتوژنتیکی با RPL مرتبط اند (۲).

¹ - Multi Factorial

۱-۴-۲- اتیولوژی

در مورد علل سقط مکرر باید گفت که حالت غیر طبیعی کروموزومی والدین تنها علت غیر قابل بحث سقط مکرر است. چنین حالات غیر طبیعی کروموزومی در ۵٪ زوج هایی که دچار سقط مکرر می شوند، حادث می شود. از سایر علل می توان به می توان به اختلالات کروموزومی و ژنتیک، اختلالات رحمی، فاکتورهای اندوکرینی، بیماری های اتوایمیون و اختلالات آلوایمیون، ترومبوفیلی و سایر عوامل دیگر اشاره کرد. البته بعد از ارزیابی واقعی در ۶۰٪ موارد، سقط مکرر غیر قابل توجیه باقی می ماند (۹-۱۱).

۱-۴-۳- عوامل ژنتیکی

سلول های سوماتیک طبیعی انسان، حاوی ۴۶ کروموزوم می باشد: ۲۲ جفت کروموزوم غیر جنسی و ۱ جفت کروموزوم جنسی. در زمان لقاح، با اتصال سر اسپرم ($1n=23$) به تخمک ($1n$) از طریق گیرنده های ZP، محتویات سر و گردن اسپرم وارد تخمک شده و در چند ساعت بعد زیگوت ($2n$) تشکیل می شود. زیگوت شش روز بعد، مرحله ی بلاستوسیست، به رحم رسیده و در دیواره خلفی یا قدامی رحم ایمپلنت می شود و پس از طی روند تکاملی نه ماهه، جنین متولد می شود.

اختلالات کروموزومی که ممکن است مربوط به تعداد یا ساختمان کروموزوم باشند، از علل مهم ناهنجاریهای مادرزادی و سقط های خودبه خودی محسوب می شوند. تقریباً ۵۰٪ از سقط ها در سه ماه اول، ۳۰٪ در سه ماهه ی دوم و ۳٪ زایمان زودرس در سه ماهه ی سوم حاملگی بعثت این اختلال رخ می دهد.

از جمله اختلالات ساختمان کروموزوم میتوان به جا به جایی های کروموزومی^۱ (متعادل یا نامتعادل)، عدم جدایی کروماتیدها^۲ در گامت ها اشاره کرد، این جابه جایی ها مشکلی را برای خود والدین ایجاد کنند، اما بر روند گامتوژنیز و تشکیل گامت های سالم تاثیر می گذارد. چنین برآورد شده است که ۵۰٪ لقاح ها به سقط خودبه خودی منتهی می شود و در ۵۰٪ این سقط ها نیز اختلالات عمده کروموزومی وجود دارند. بنابراین، تقریباً در ۲۵٪ محصولات لقاح یک نقص عمده کروموزومی دیده می شود. اختلالات

^۱ -Translocation

^۲ - Nondisjunction

کروموزومی شایع تر در جنین های سقط شده، 45X (سندرم ترنر)، تریپلویدی و تریزومی ۱۶ هستند (12).

نحوه توزیع اختلالات کروموزومی مشاهده شده در افراد دارای سابقه RPL با جمعیت عمومی تفاوتی ندارد. زنانی که سابقه RPL دارند، بویژه در سنین ۳۵ سال و کمتر، کروموزوم های نرمال (یوپلویدی) که منجر به سقط می شوند بیشتر است. در نتیجه میتوان گفت که فراوانی کاریوتایپ طبیعی در جنین های سقط شده این بیماران، نشان گر اهمیت بیشتر فاکتورهای مادری در عدم بارداری موفق است (۱۳، ۱۴).

سن باروری در زنان با افزایش ریسک سقط ارتباط دارد، که این مسئله ناشی از افزایش شیوع آنابلویدی اووسیت ها در این افراد می باشد (۶)

۱-۴-۴-عوامل انعقادی

اخیرا توجه زیادی به نقش ترومبوفیلی های ارثی در ایجاد RPL معطوف شده است. در این گروه هتروژن، اختلالات منجر به افزایش بروز ترمبوز وریدی یا شریانی می شود. ارتباط این تغییرات با سقط، هم بر پایه تغییرات فرضی و هم بر پایه تغییرات اثبات شده در رشد و تکامل جفت، استوار است. عروقی شدن غیر طبیعی جفت و ترومبوز نامناسب جفت، ارتباط این وضعیت ترومبوفیلیک را با سقط مطرح می کند. هر چند این وضعیت های ترومبوفیلیک ممکن به صورت اکتسابی نیز ایجاد شوند، ولی غالباً ارثی هستند. آن دسته از ترومبوفیل های ارثی که بیشتر از همه با RPL در ارتباطند، عبارتند از: هیپرهوموسیستئسمی، مقاومت به پروتئین C فعال (در ارتباط با جهش های فاکتور V لیدین)، کمبود پروتئین C و S، جهش هایی در پیش برنده ژن پروترومبین و جهش های ژن آنتی ترومبین III (۱۵).

۱-۴-۵- اختلالات آناتومیک

تقریباً در ۱۲-۱۵٪ زنانی که دچار سقط های مکرر هستند، ناهنجاری های رحمی وجود دارد که بهترین راه تشخیص آن، سونوگرافی واژینال است. هیستروسالپینگوگرافی دقت نسبتاً کمی دارد و نباید تنها بر اساس آن تصمیم گیری کرد (۶). این عوامل آناتومیک می تواند اکتسابی یا مادرزادی باشد. علل مادرزادی شامل فیوژن ناکامل مجاری مولر، جذب ناکامل سپتوم و آنومالی سرویکس رحم می باشد. از نظر تاریخی همه آنومالی های مادرزادی مجرای تناسلی، با سقط خودبخودی منفرد و مکرر مرتبط است. همچنین میتوان به میوم های زیر مخاطی و چسبندگی های داخل رحمی اشاره کرد (۳). اگرچه قوی ترین همراهی سقط با ناهنجاری ناشی از مصرف دی اتیل استیل بسترول^۱ و سپتوم داخل رحمی است (۱۵).

۱-۴-۶- علل ایمنی

از دلایل ایمونولوژیک سقط مکرر مکانیسم های اتوایمیون و آلوایمیون برای سقط جنین پیشنهاد شده اند (۱۵)، که اتوایمیون شامل آنتی کواگولان های لوپوسی، آنتی بادی آنتی کاردیولیپین و آنتی بادی آنتی فسفولیپید (APS) هستند. این سندرم با ترومبوز شریانی یا وریدی، ترومبوسیتوپنی و سقط جنین در نیمه دوم حاملگی مشخص می شود و ممکن است به تنهایی و یا همراه با لوپوس یا سایر اختلالات خود ایمنی رخ دهد. آلوایمیون شامل کمبود آنتی بادی های بلوکان و ایمونودیستروفیسم (ترشح سیتوکین های Th1) بجای سیتوکین های بالقوه ترجیحی (Th2) است (۱۶).

آنتی بادی ضد تیروئید نیز با خطر بالای سقط مکرر همراه است. خانم هایی که این آنتی بادی ها را دارند، بیماری تیروئید آشکار ندارند، بنابر این اتو آنتی بادی ضد تیروئید یک مارکر غیر وابسته برای افزایش خطر سقط است (۱۷). یک فاکتور اتوایمیون دیگر که در سقط مکرر اهمیت دارد، تغییر در سلول های ایمنی مقیم در اندومتر است. سلول های کشنده طبیعی^۲ (NK)، موجود در دسیدوا پس از تحریک با اینترلوکین ۲، سلول های تروفوبلاست انسانی را از بین میبرند. در افراد RPL فعالیت سلول های کشنده

1 - Diethylstilbestrol

2 - Natural Killer Cells (NK Cells)

بیش از گروه کنترل است. این احتمال وجود دارد که تغییر در سلول های ایمنی مقیم در اندومتر باعث تغییر در ترشح سایتوکین ها می شود (۱۸)

زنانی که سقط های مکرر آنان به احتمال زیاد علت ایمونولوژیک دارد، ویژگی های زیر را نشان می دهند:

۱- سابقه تعداد زیادی سقط خودبخودی را ذکر می کنند.

۲- اخیراً هیچ حاملگی ترمی نداشته اند.

۳- زیر ۳۵ سال هستند

۴- محصولات طبیعی سقط شده حالت طبیعی دارند.

۵- معمولاً حداقل یک سقط پس از ۳ ماه اول رخ داده است (۶).

در مطالعه ای که توسط Quenby و همکارانش صورت گرفت، سقط راجعه را با سندرم آنتی فسفولیپید و وضعیت های پروترومبیک دیگر مرتبط دانسته اند. سقط های راجعه مرتبط با سندرم آنتی فسفولیپید و ایدیوپاتیک با خطر ترومبوزیس طولانی مدت مرتبط هستند و بر اساس آمارها سابقه سقط مکرر یک ریسک فاکتور برای ترومبوز بعدی در طولانی مدت محسوب می شود (۱۹).

۱-۴-۷- علل عفونی

همانگونه که در جدول (۱-۱) آمده است، عفونت ها علت ۵/۸٪ از تمام موارد سقط می باشند. فراوانی تیترا آنتی بادی بر علیه کلامدیا تراکوماتیس در زنان با سقط مشاهده شده است، اما تا کنون ارتباطی بین عفونت و آلودگی به کلامدیا تراکوماتیس و سقط مکرر در جمعیت یافت نشده است. نقش آلودگی های توکسوپلازما، سرخجه، سیفلیس مادرزادی اغلب در سقط مکرر بی اهمیت بوده و در غربارگری های متداول توصیه نمی شوند (جدول ۱-۱). عفونت از جمله لیستریا، توکسوپلازما، سیتومگالو ویروس، هرپس ژنیتال اولیه نیز از علل دیگر شناخته شده در سقط مکرر می باشد. تحقیقات صورت گرفته موید آن است که سیتومگالو ویروس ها در بدن باقی مانده و از آنجایی که درمان خاصی ندارد، در حاملگی های

بعدي فعال شده و منجر به پاسخ هاي ايمني سلولي و توليد سايتوکاين هاي التهابي و در نتيجه منجر به سقط مي گردد (۱۰).

جدول ۱-۱ : فراواني عوامل سقط مکرر در ۴۵ زن مبتلا به RPL.

فاکتور	فراواني (%)
ژنتیک	۳/۱
هورموني	۲۰/۲
آناتوميک	۲۱/۶
ايمونولوژی	۲۵
عفونت	۵/۸

۱-۴-۸- اختلالات اندوکرين

اختلالات اندوکرين از ديگر عوامل سقط مي باشند. حاملگي كاملا وابسته به تغييرات اندوکرينولوژيک زمان بندي شده سيکل قاعدگي است. آن دسته از اختلالات هورموني که در نهايت امکان تداوم حاملگي را مختل مي کنند، ممکن است آثار خود را در طی مرحله ای از سيکل که در آن لقاح اتفاق مي افتد و يا حتی زودتر اعمال کنند. سقط خودبخودي قبل از هفته دهم بارداری، ممکن است در اثر تغييرات توليد پروژسترون يا مصرف آن باشد، که مي تواند شامل ناتواني جسم زرد در توليد مقادير کافي پروژسترون، اختلال رسيدن پروژسترون به رحم، و يا مصرف نامناسب پروژسترون توسط ديسيدوآی رحمی باشد. همچنين نارسايی بارداری ممکن است نزديک به زمان شيفت جسم زرد- جفت (هفته ۹-۷)، در صورت عدم توانايی تروفوبلاست ها در توليد پروژسترون بيولوژيک پس از کاهش فعاليت جسم زرد، اتفاق بيفتد (۱۵).

عوامل هورمونی مرتبط با RPL عبارتند از : نارسایی فاز لوتئال، دیابت شیرین، ترشح بیش از حد هورمون های لوتئیزان (LH)، کاهش استرادیول سرمی (E2)، بیماری تیروئید و احتمالاً مقاومت به انسولین و سندرم پلی کیستیک تخمدان (PCO)، هیپرپرولاکتیمی و کاهش ذخایر تخمدان (۹، ۲۰).

۱-۴-۹- عوامل دیگر

مطالعات نشان می دهند عوامل محیطی^۱ می توانند زنان را برای سقط مستعد نماید. تماس بیش از حد با سرب، جیوه، اکسیداتیلن، اشعه یونیزان و دی بروموکلروپان، با مشکلات تولیدمثلی و نیز سقط خودبخود همراه است. همچنین گازهای بیهوشی، حلال های آلی و میدان های مغناطیسی با سقط جنین و مشکلات تولیدمثلی مرتبطند (۱۶).

طبق گزارش ها، کشیدن سیگار، مصرف الکل و نوشیدن قهوه، با افزایش خطر سقط های مکرر همراهند. استعمال دخانیات باعث هیپوکسی می شود که یکی از تنظیم کننده های بیان آنژیوپوئتین^۲ است. بنابراین استعمال دخانیات بر روی عروق جفت تاثیر می گذارد (۶). در معرض قرار گرفتن با بیس فنل A^۳ نیز با سقط مکرر مرتبط می باشد (۲۱).

تغییرات ایمونولوژیک وابسته به فلزات سنگین ممکن است با سازگاری فیزیولوژیک سیستم ایمنی با وضعیت حاملگی تداخل کند و منجر به سقط شود. تغییرات ایمونولوژیک و هورمونی وابسته به فلزات سنگین می توانند فاکتور مهمی در پاتوژنز سقط های مکرر باشد (۲۲).

فاکتورهای روانی نظیر استرس، زنان را برای سقط و سقط مکرر مستعد می نماید. تولید افزوده $TNF-\alpha$ در بیماران با سابقه سقط در سه ماه اول بارداری که استرس بالایی داشته اند، مشاهده شده است. بنابراین فاکتورهای روانی عصبی ایمنی از عوامل سقط مکرر می باشند. بررسی ها نشان داده است که استرس با تعادل $Th1/Th2$ مرتبط است. استرس تجربه شده توسط یک زن باردار سیستم های هشدار دهنده را فعال ساخته و منجر به پس زدن جنین می شود (۲).

¹ - Environmental Factor

² - Angiopoietin

³ - Bisphenol A (BPA)

ناهنجاریهای جفت نیز می تواند با سقط ۳ ماه دوم در ارتباط باشد، که از آن جمله می توان به جفت هلالی و جفت کناری اشاره نمود(۱۶).

بیماری های مادر نیز می توانند تاثیر بسزایی در ایجاد سقط داشته باشند. بیماری های کلاژن واسکولار مثل لوپوس، بیماری های شدید قلبی-ریوی و کلیوی، میزان بالای مس در بیماری ویلسون و عدم تحمل متیونین که با هیپرهموسیستینمی در ارتباط است و نقایص دخیل در مکانیسم فیزیولوژیک ضد انعقادی با سقط های مکرر مرتبط می باشند(۱۶).

هنگامی که آلودگی ها علت اصلی مرگ زودرس در بریتانیا بود، رابطه معکوس بین اندازه خانواده و طول عمر زنان اشرافی وجود داشت. این ثابت می کند که فاکتورهای بقا مرتبط با آلودگی های جنینی نظیر وبا و توبرکلوسیس در طی دوران کودکی اثر منفی بر روی باروری فرد در آینده دارد(۲۳).

عوامل پدری نیز می توانند در بارداری ناموفق دارای اهمیت باشند. فاکتور های ژنتیک، سیمن و دیگر عوامل مثل سن و مصرف الکل توسط پدر در سقط های مکرر موثر است(۲۴).

سن بالای اووسیت قبل از تخمک گذاری و سن بالای گامت بعد از تخمک گذاری می تواند در سقط های مکرر موثر باشند(۱۶).

۱-۵- سیستم اندوکراین

سیستم اندوکراین متشکل از مجموعه‌ای از غدد و سلول‌ها می‌باشد، که هر کدام هورمونی ویژه‌ای را با هدف تنظیم کارکرد بدن به جریان خون تراوش می‌کنند. در مقابل سیستم اندوکراین که مواد شیمیایی را به جریان خون آزاد می‌کند، سیستم اگزوکراین قابل تعریف می‌باشد. این سیستم نیز متشکل از غدد و سلول‌ها می‌باشد که مواد مترشح خود را توسط مجاری هدایت می‌کنند. اندوکراین یک واژه یونانی می‌باشد که از کلمه *endo* به معنای درون و *crinis* به معنی ترشح برگرفته شده است.

غدد در طی زندگی جنینی از اپیتلیوم‌های پوشاننده منشا می‌گیرند. تکثیر و تهاجم سلول‌های اپیتلیال به بافت همبند زیرین و به دنبال آن تمایز بیشتر سبب تشکیل غدد می‌شود. غدد برون ریز (*exocrine glands*)، غددی هستند که ارتباط خود را با اپی تلیوم سطحی که از آن منشا گرفته اند حفظ می‌کنند. این ارتباط به صورت مجاری لوله ای است که با سلول‌های پوششی مفروش شده اند و از طریق آن‌ها ترشحات غددی به سطح می‌رسند. از جمله این غدد می‌توان به غدد بزاقی^۱، عرق^۲ و غدد موجود در سیستم گوارشی^۳ اشاره کرد. غدد درون ریز (*endocrine glands*)، غددی هستند که در طی تکامل رویان ارتباط خود را با سطح از دست داده اند. بنابراین غدد مزبور فاقد مجرا هستند و ترشحات آن‌ها به جای سیستم مجاری، توسط جریان خون به محل عملکرد حمل می‌شود. از جمله این غدد می‌توان به هیپوتالامس، هیپوفیز، غدد آدرنال، تیروئید و پاراتیروئید اشاره کرد (شکل ۱-۱). علاوه بر غدد اندوکراین، برخی از ارگان‌ها مانند کلیه، کبد، قلب و گنادها نیز توانایی تولید هورمون دارند. از جمله هورمون‌های مترشح از کلیه می‌توان به رنین^۴ و اریتروپویتین^۵ اشاره کرد.

هورمون‌ها تنظیم عملکردهای مختلف از جمله، تنظیم متابولیسم بدن، رشد و تکامل، تنظیم عملکرد ارگان‌های بدن و تغییرات خلق و خو و به طور کلی حفظ ثبات بدن را برعهده دارند.

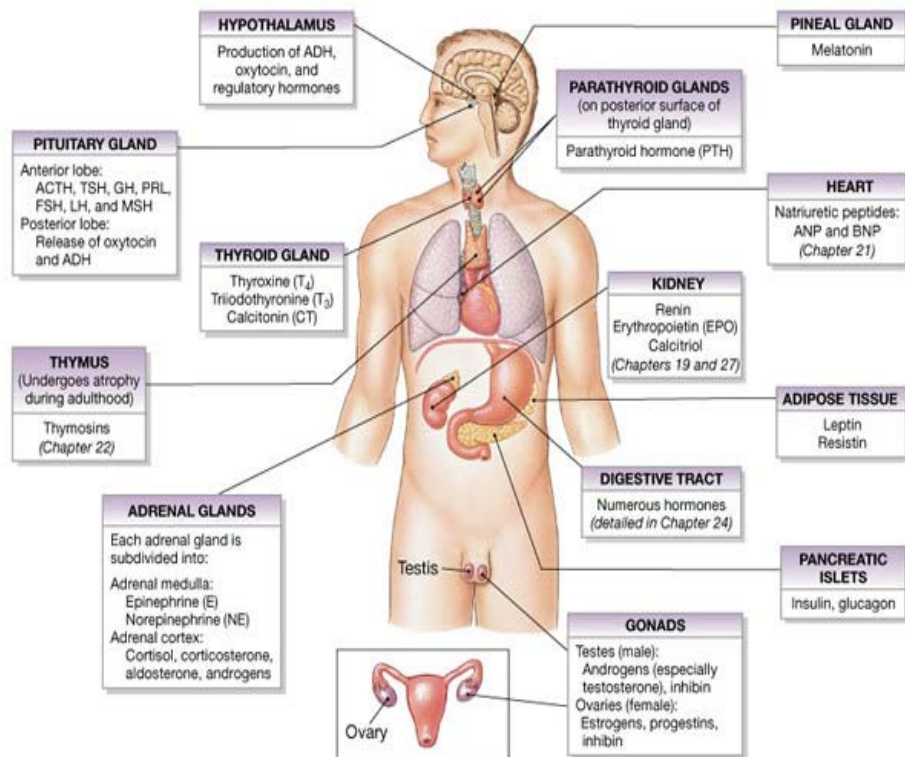
1 - Salivary Gland

2 - Sweat Gland

3 - Gastrointestinal system

4 - Renin

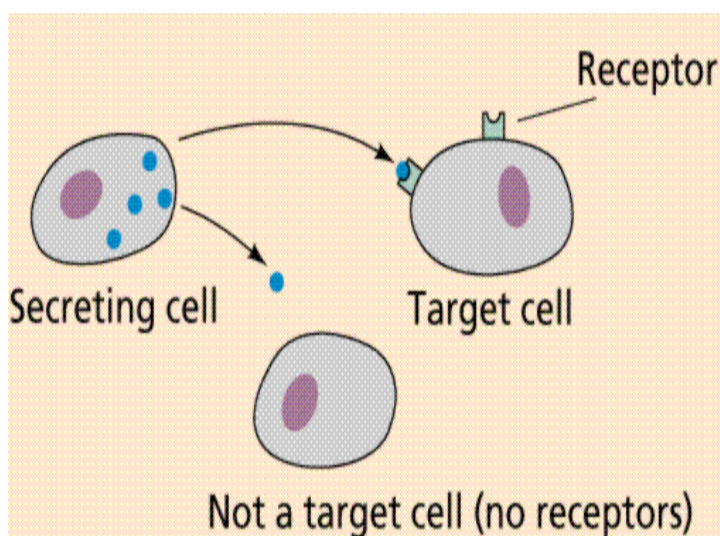
5 - Erythropoietin



شکل ۱-۱: غدد اندوکرین موجود در بدن را نشان می دهد. هر غده درون ریز با ترشح هورمون هایی مخصوص تنظیم فعالیت های مختلف بدن را برعهده دارد. هرگونه اختلال در ترشح هورمون ها منجر به ایجاد علائم می شود. در این تصویر همچنین ارگان هایی که اعمال اندوکرین دارند مشخص شده است: قلب، کلیه، تیموس، سیستم گوارش و گنادها. علاوه بر آنچه گفته شد، بسیاری از ارگان ها و سلول های توزیع یافته در بدن، عملکرد اندوکرین دارند. این ارگان ها و سلول ها شامل سلول های چربی که هورمون لیپتین ترشح می کنند و سلول های اندوتلیال عروقی که پلی پپتیدهایی به نام اندوتلین را برای تسریع انقباض عروق ترشح می کنند، می باشند.

۱-۶- هورمون

هورمون یک کلمه یونانی به معنی برانگیختن^۱ می باشد. تمام هورمون ها برای به انجام رساندن نقش بیولوژی خود ابتدا با یک پروتئین پذیرنده خاص (رسپتور) که در غشاء و یا در داخل سلول قرار گرفته پیوند می یابند. بافت هدف، بافتی است که دست کم حاوی یک رسپتور برای هورمون مربوط باشد. هر رسپتور دارای دو جایگاه فعال می باشد یکی جایگاه فعال گیرنده که عمل آن شناسایی و برقراری پیوند با هورمون می باشد و دیگری جایگاه فرستنده پیام های بیولوژی می باشد که در نهایت امر با تغییر فعالیت یک یا چند آنزیم خاص موجب تنظیم اعمال داخل سلولی می گردند. رسپتور هورمون های پپتیدی، پروتئینی و گلیکو پروتئینی در غشاهای سلولی و رسپتور هورمون های استروئیدی و تیروئیدی به ترتیب در سیتوپلاسم و یا هسته سلول هدف قرار گرفته اند (شکل ۱-۲) (۲۵).



شکل ۱-۲: سلول هایی که دارای گیرنده های هورمون باشند می توانند نسبت به آن هورمون خاص پاسخ گو باشند (۲۵).

^۱ - Impetus

تعداد و نیز فعالیت رسپتور در سلول هدف متغیر بوده و متناسب با نیازهای فیزیولوژی سلول قابل تنظیم می باشد. همین طور برخی از بیماری ها و یا داروها نیز قادرند بر روی تعداد و فعالیت رسپتور تأثیر داشته باشند .

هورمون ها را براساس ساختمان شیمیایی و عملکرد آن ها به سه دسته طبقه بندی می کنند:

الف- هورمون های پلی پپتیدی و پروتئین ها مانند هورمون رشد و انسولین (محلول).

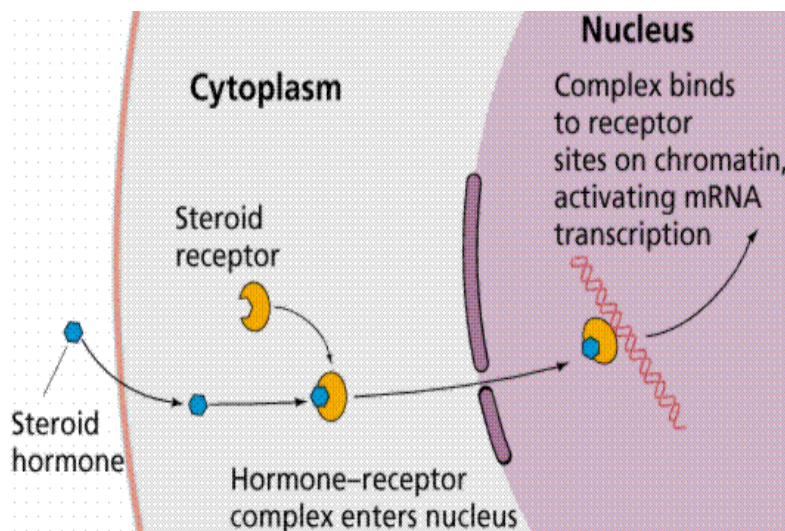
ب- مشتقات آمینو اسیدها و اسید های چرب مانند هورمون های تیروئیدی (محلول).

ج- استروئیدها مانند تستوسترون (نامحلول).

۱-۶-۱- هورمون های استروئیدی

هورمون های استروئیدی از کلسترول^۱ مشتق می شوند و کم و بیش دارای خواص لیپیدی می باشند. از غشای سلول ها به آسانی عبور می نمایند و با رسپتور خود که دارای میل ترکیبی و ویژگی بسیار زیادی برای آنها می باشد پیوند می یابند و کمپلکس استروئید - رسپتور را تشکیل می دهند. کمپلکس استروئید - رسپتور تحت شرایط خاصی از درجه حرارت و غلظت نمکی فعال می گردد و در اثر تغییراتی که در اندازه، شکل فضایی و بار الکتریکی آن ایجاد می شود توانایی پیوند یافتن با کروماتین سلول را پیدا می کند. سرانجام پس از پیوند یافتن کمپلکس فعال شده با جایگاه خاصی از رشته DNA منجر به ایجاد تغییرات در بیان ژن مورد نظر می شود (شکل ۱-۳) (۲۶، ۲۷).

¹ -Cholesterol



شکل ۱-۳: در این شکل عملکرد هورمون های استروئیدی نشان داده شده است (۲۶).

هورمون های استروئیدی بر اساس گیرنده هایی که به آن ها متصل می شوند، به پنج گروه تقسیم می شوند:

۱- گلوکوکورتیکوئیدها.

۲- مینرالوکورتیکوئیدها.

۳- آندروژن ها.

۴- استروژن ها.

۵- پروژسترون ها.

۶- ویتامین D و متابولیت های آن که در پوست، کبد و کلیه سنتز می شوند.

اسیدهای صفراوی که هفتمین گروه مهم استروئیدهای پستانداران بوده و فعالیت هورمونی شناخته شده ای ندارند اساساً در کبد ساخته می شوند.

به دنبال ترشح هورمون های استروئیدی از بافت منبع، همه این هورمون ها به یک یا چند پروتئین پلاسمایی اتصال می یابند. برای استروئیدهای جنسی یک پروتئین پلاسمایی بتا گلوبین وجود دارد که جهت انتقال هردوی آندروژن ها و استروژن های گزینش شده به خدمت گرفته می شود. این گلیکو پروتئین که گلوبلین متصل شونده به هورمون ها ی استروئیدی^۱ (SHBG) نامیده می شود. SHBG دارای میل اتصالی زیادی به 17 بتا -هیدروکسیل می باشد؛ از این رو، به دی هیدروتستوسترون^۲ (DHT)، تستوسترون^۳، آندرواستندیول^۴، استرادیول^۵ و استرون^۶ با میل اتصالی بالا اتصال می یابد. در این میان دی هیدرو اپی آندرواسترون^۷ (DHEA) تمایل کمتری برای اتصال به SHBG دارد، اما فرم سولفات آن DHEA-S به راحتی و با تمایل بالاتری به SHBG متصل می شود (۲۸). آندرواستندیون توانایی اتصال به SHBG را نداشته و تنها می تواند به آلبومین متصل شود (۲۹). در این میان پروژسترون یا کورتیزول نیز توانایی اتصال به SHBG را ندارند. SHBG به طور عمده بیشتر در کبد ساخته می شود، اما مغز، رحم، بیضه و جفت نیز توانایی تولید این گلیکو پروتئین را دارند. SHBG تولید شده در بیضه توسط سلول های سترولی، آندروژن باندینگ پروتئین^۸ (ABP) نام می گیرد و توانایی اتصال به تستوسترون، DHT و ۱۷- بتا استرادیول را دارد. پس از بلوغ سطوح پلاسمایی SHBG در مردان نسبت به زنان کاهش می یابد (۳۰). در زنان باردار میزان SHBG از زمان لقاح و لانه گزینی تا هفته سی ام بارداری، ۶ الی ۱۰ برابر بیشتر از زنان غیر حامله می باشد (۳۱).

1 - Sex hormone-binding globulin

2 - Dihydrotestosterone

3 - Testosterone

4 - Androstenediol

5 - Estradiol

6 - Estrone

7 - Dehydroepiandrosterone

8 - Androgen Binding Protein

۱-۷- استروژن ها^۱

استروژن ها گروهی از ترکیباتی هستند که در سیکل استروس انسان و سایر حیوانات حائز اهمیت می باشند. تحقیقات حاکی از آن است که این ترکیبات هم در مهره داران (۳۲) و هم در حشرات تولید می شوند. وجود استروژن ها در حشرات و مهره داران نشان دهنده قدیمی بودن این ژن در طی سیر تکاملی جانداران می باشد.

استروژن یکی از دو هورمون جنسی استروئیدی در زنان است که بوسیله تخمدان ترشح می شود. اکثر تنظیم های هیپوفیزی تخمدان با تأثیر دو هورمون استروژن و پروژسترون صورت می گیرد. استروژن در رشد جنینی، بروز صفات ثانویه جنسی، سیکل باروری و نگهداری بارداری نقش مهمی ایفا می کند. علاوه بر این استروژن رشد و تمایز سلول های اندومتر را نیز تنظیم می کند (۳۳). استروژن همچنین در فرایندهای آسیب شناسی بیماری های وابسته به هورمون مثل سرطان تخمدان، سینه، روده و استخوان نیز تأثیر دارد (۳۴).

به طور طبیعی در بدن خانم ها سه نوع استروژن تولید می شود: استرون^۲ (E1)، استرادیول^۳ (E2) و استریول^۴ (E3). در این میان استرادیول در طول دوران تولیدمثلی در بدن غالب بوده و سطح آن را می توان در سرم خون اندازه گیری نمود. در طول دوران یائسگی استرون (E1) در بدن غالب می باشد و اما در طی دوران بارداری سطح استریول در سرم خون بالاترین می باشد. اگرچه در میان استروژن ها در بدن E3 بیشترین است اما این هورمون بسیار ضعیف می باشد، و این در حالی است که استرادیول قوی ترین استروژن بوده و قدرت آن ۸۰ برابر بیشتر از E3 می باشد. نوع دیگری از استروژن که تنها در زمان بارداری تولید می شود استترو^۵ (E4) نام دارد. تمامی استروژن های موجود در بدن از تبدیل آندروژن ها^۶، به خصوص تستوسترون^۷ و آندرواستندیون^۸ توسط آنزیم آروماتاز^۹ تولید می شوند. غده آدرنال جنین

1 - Estrogen or Oestrogen

2 - Estrone

3 - Estradiol

4 - Estriol

5 - Estetrol

6 - Androgens

7 - Testosterone

8 - Androstenedione

9 - Aromatase Enzyme

به عنوان یک منبع دی هیدرواپی آندروسترون سولفات (DHEA sulfate) می باشد که به عنوان یک پیش ساز برای استریول در جفت و مادر عمل می کند.

فعالیت استروژنی محدود به ساختار استروئیدها نبوده و ترکیباتی مانند دی اتیل استیل بسترول فعالیت قوی استروژنی دارند.

به طور کلی جنبه های مختلف باروری، شکل گیری فولیکولها و بلوغ تخمکها تحت تأثیر استروژن و گنادوتروپین های هیپوفیزی شامل FSH و LH صورت می گیرد.

در افراد مونث منبع اصلی و اولیه تولید استروژن تخمدان ها می باشد، که در دوران بارداری این وظیفه در درجه اول بر عهده جفت می باشد. هورمون محرک فولیکولی (FSH) که تحت تأثیر GnRH مترشح از هیپوتالامس، از آدنو هیپوفیز ترشح می شود، تولید استروژن در تخمدان ها را تحریک می کند. برخی از بافت ها، از جمله کبد، غدد آدرنال و پستان به مقدار کمی استروژن تولید می کنند. دومین منبع اصلی تولید استروژن در بدن سلول های چربی می باشند، که این منع از استروژن در زنان یائسه بسیار حائز اهمیت می باشد (۳۵).

استروژن، بسیاری از اعمال تولید مثلی را تنظیم می کند که از جمله آن ها می توان به تولید پروژسترون و تنظیم جریان خون رحمی-جفتی اشاره کرد (۳۶). به علاوه استروژن در طی دوران قبل از لانه گزینی رویان و در تمام دوران حاملگی مورد نیاز است (۳۷). به طور خلاصه این هورمون دارای نقش اساسی در رشد و تکامل رویان و جنین، صفات ثانویه جنسی، سیکل تولیدمثلی، باروری و تقویت حاملگی است. خارج کردن جسم زرد در مراحل اولیه حاملگی، باعث کاهش سطح سرمی استروژن و پروژسترون می شود که این امر منجر به سقط می گردد (۳۸). هورمون های استروئیدی در تنظیم تغییرات مویرگ های خونی اندومتريوم، نفوذ پذیری آن ها و جریان خون نقش مهمی دارند (۳۹-۴۱). این تغییرات نقش مهمی را در فیزیولوژی رحم و داشتن حاملگی موفق ایفا می کنند.

تحقیقات جدید نشان می دهد که تغییرات بسیار اندک در سطح استروژن زنان می تواند توجیه کننده ۷۰٪ جنین های سالمی باشد که در لانه گزینی دچار مشکل می شوند (۴۲).

استروژن تأثیرات خود را از طریق گیرنده هایش (ER) اعمال می کند.

۱-۷-۱- گیرنده های استروژنی

در اواخر دهه ۱۹۵۰ Jensen و Jacobsen وجود گیرنده هایی که توانایی اتصال به ۱۷- بتا استرادیول را دارند، به اثبات رسانند (۴۳). دومین رسپتور استروژنی نیز در سال ۱۹۹۶ گزارش شد (۴۴). این دو رسپتور استروژنی امروزه با نام های $ER\alpha$ و $ER\beta$ شناخته می شوند. گیرنده های استروژن به طور اولیه در سلول های رحم، واژن، پستان و مغز و به طور اختصاصی در تخمک، سلو لهای گرانولوزا و سلول های اپی تلیال تخمدان وجود دارند (۴۵).

از نظر مکانیسم عملکرد، گیرنده های استروژنی را در دو طبقه تقسیم بندی می کنند؛ الف- گیرنده هایی که جزو خانواده گیرنده های هسته ای می باشند (ER). ب- گیرنده هایی که به پروتئین G اتصال می یابند^۱ (GRER). در ادامه بحث گیرنده های گروه الف مورد بحث و بررسی قرار می گیرد.

گیرنده های استروژنی (ER) مجموعه ای از فاکتورهای رونویسی هستند که با اتصال لیگاند فعال می شوند و جزو خانواده گیرنده های هسته ای^۲ (NR) می باشند. NR ها از نظر ساختمانی بسیار شبیه هم هستند و از پنج دومین مشابه تشکیل شده اند (شکل ۱-۴) (۴۶، ۴۷)؛

۱- N (A-B) دومین تنظیمی^۳: دارای AF1^۴ می باشد، که فعالیت آن غیر وابسته به لیگاند است (۴۸). فعالیت رونویسی AF1 در حالت عادی بسیار کم است، اما با AF2 موجود در دومین E حالت سینرژسم داشته که در این حالت می توانند بیان ژن را به مقدار زیادی افزایش دهند. در میان NR ها توالی دومین A-B بسیار متغیر می باشد.

۲- دومین متصل شونده به DNA^۵ (DBD): توالی بسیار محافظت شده ای در NR ها می باشد و به توالی خاصی از DNA به نام HRE^۶ متصل می شود.

۳- ناحیه لولایی^۷: دومین انعطاف پذیری می باشد که DBD را به دومین LBD متصل می کند.

1 - G protein- coupled receptor

2 - Nuclear Hormone Receptor Superfamily

3 - N terminal regulatory domain

4 - Activation Function 1

5 - DNA- binding domain

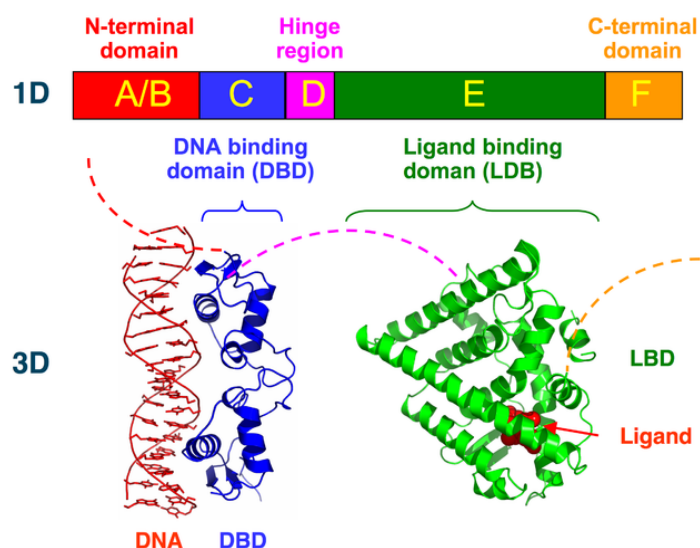
6 - Hormone response elements

7 - Hinge region

۴- دومین متصل شونده به لیگاند^۱ (LBD): این دومین نسبتاً از نظر توالی در NR های متفاوت محافظت شده است. این دومین دارای AF2 است، که هنگام اتصال لیگاند به LBD فعال می شود (۴۸).

۵- دومین C^۲: این دومین از نظر توالی در NR های متفاوت های متفاوت بسیار متغیر می باشد.

Structural Organization of Nuclear Receptors

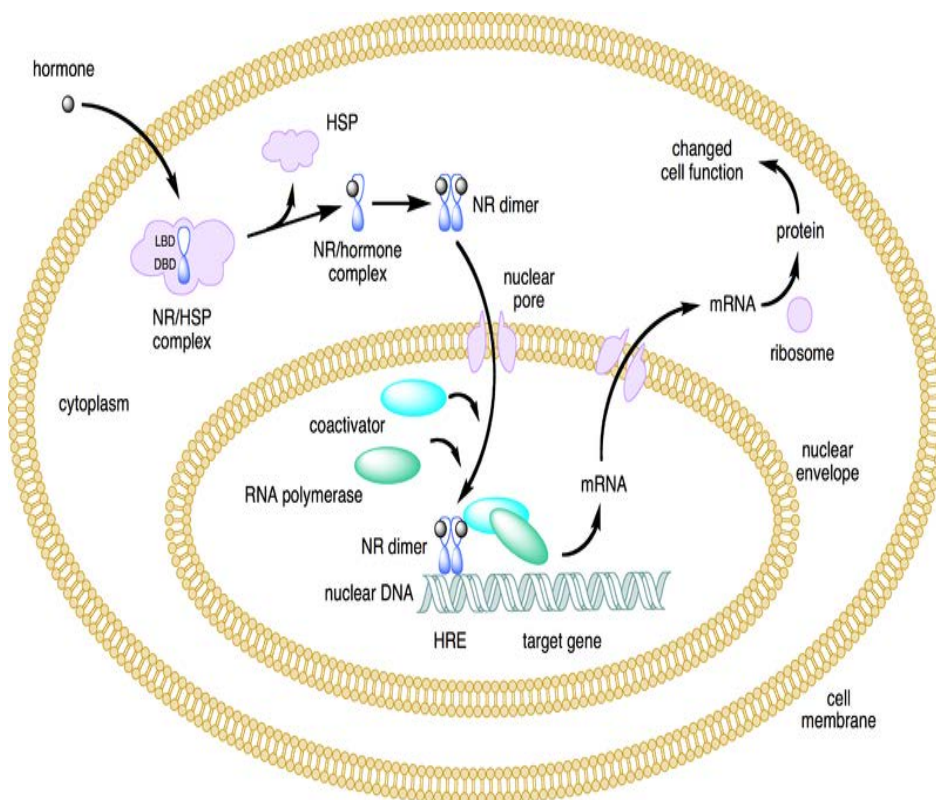


شکل ۱-۴: ساختمان گیرنده های هسته ای، که از پنج دومین تشکیل شده اند.

هنگامی که لیگاند به گیرنده استروژنی متصل می شود، گیرنده فرم دایمر را تشکیل می دهد تا کمپلکس لیگاند-رسپتور کامل شود. از آنجایی که دو فرم گیرنده های استروژنی در اکثر بافت ها بیان می شود، دایمر ها می توانند فرم هومودایمر ($ER\alpha$ ($\alpha\alpha$) یا $ER\beta$ ($\beta\beta$) و یا هتروداایمر ($ER\alpha\beta$ ($\alpha\beta$)) را تشکیل دهند (شکل ۱-۵) (۴۹).

1 - Ligand binding domain

2 - C terminal domain

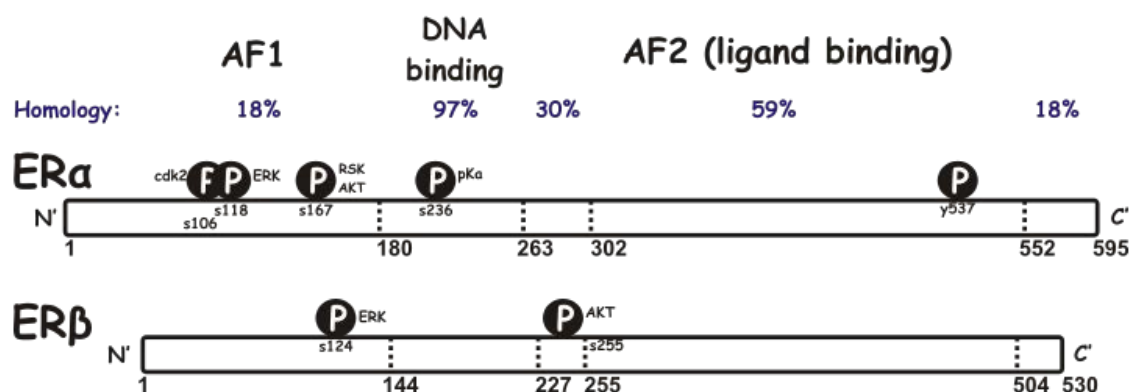


شکل ۵-۱: این شکل مکانیسم عملکرد ER نشان داده شده است. در غیاب لیگاند این گیرنده ها در سیتوزول قرار دارند. پس اتصال لیگاند به این گیرنده ها، گیرنده فرم دایمر را تشکیل داده و به درون هسته انتقال می یابند و با اتصال به DNA منجر به تغییر در بیان ژن ها و در نهایت تغییر در عملکرد سلول می شوند (۵۰)

دو گروه اصلی از گیرنده های استروژنی $ER\alpha$ و $ER\beta$ هستند (۵۱، ۵۲). $ER\alpha$ بر روی کروموزوم ۶ و در جایگاه 6q25.1 قرار دارد. این ژن شامل هشت اگزون و ۴۰ kilobases می باشد (۵۳، ۵۴). ژن $ER\alpha$ در اکثر بافت ها بیان می شود. $ER\beta$ بر روی کروموزوم ۱۴ قرار دارد و در بررسی که در سال ۱۹۹۷ با استفاده از تکنیک FISH صورت گرفت، مشخص شد، ژن این گیرنده در جایگاه 14q22-24.1 قرار دارد (۵۵). این ژن شامل هشت اگزون و ۱۴۰ kilobases می باشد (۵۶، ۵۷). در بررسی که بر روی سلول های گرانولوزا صورت گرفت، تنها $ER\beta$ mRNA یافت شد، که بیان می کند، این

گیرنده در رشد فولیکول و اووسیت دارای اهمیت می باشد. همچنین مشخص شد $ER\beta$ تنها گیرنده استروژنی است که در سلول های اندوتلیالی بند ناف بیان می شود.

$ER\alpha$ و $ER\beta$ از نظر ساختمانی و توالی آمینواسیدی بسیار با هم هومولوژی داشته و هر دو از پنج دومین تشکیل شده اند (شکل ۱-۵).



شکل ۱-۶: ساختمان و هومولوژی دومین های $ER\alpha$ و $ER\beta$ در شکل نشان داده شده است. در این شکل همچنین برخی از نقاط فسفریله شده که در تنظیمات غیر وابسته به لیگاند نقش دارند، نیز مشخص شده است.

بیان $ER\alpha$ mRNA در بلاستوسیت و رویان دو سلولی، نشان دهنده نقش مهم و اساسی استروژن در رشد و تکامل رویان می باشد. در انسان $ER\alpha$ دارای حداقل سه پروموتور جداگانه به همراه بیان متفاوت در بافت های گوناگون می باشد (۵۸-۶۰). هردو گیرنده های استروژنی $ER\alpha$ و $ER\beta$ در رگ های رحمی، به خصوص در عضلات صاف دیواره رگ ها و به طور معمول در سلول های اندوتلیالی قابل شناسایی هستند (۶۱، ۶۲). در طول بارداری، تولید ۱۷-بتا استرادیول تا ۸۰ برابر افزایش پیدا می کند (۶۳، ۶۴). در تحقیقات به عمل آمده مشخص شد که استروژن تاثیرات مهم و اساسی خود را در طول بارداری از قبیل؛ تحریک تمایز سلول ها و فعالیت نرمال جفت، از طریق $ER\alpha$ اعمال می کند (۶۵).

۱-۸- مطالعات انجام گرفته بر روی نقش پلی مورفیسم گیرنده های استروژنی در سقط مکرر

ژنوم انسان تقریباً شامل ۲۵ تا ۴۰ هزار ژن می باشد که در ۳/۲ میلیارد نوکلئوتید DNA کد شده است. ژنوم افراد مختلف تقریباً ۹۹/۹٪ مشابه یکدیگر می باشند؛ ولی تفاوت در ۰/۱٪ ژنوم باعث ۱۱ میلیون نوع پلی مورفیسم ژنی می گردد (۶۶). پلی مورفیسم و یا تفاوت های ژنتیکی در ژن های کدکننده پروتئینها ممکن است مسئول بعضی تفاوت های مشاهده شده در زمینه فیزیولوژیک، بیوشیمی و پاسخ به داروها باشد.

تا به امروز مطالعات زیادی در رابطه با پلی مورفیسم گیرنده های استروژنی در بخش های مختلف بدن و بیماری های انسانی صورت گرفته است. همانطور که ذکر شد این گیرنده ها در سلول های مختلفی بیان می شوند، به همین دلیل مطالعات بسیار زیادی بر بیماری های مختلف انجام شده است، مانند سرطان سینه، سرطان تخمدان و رحم، اندومتریوز، پوکی استخوان، ترومبوز وریدی، تنگی عروق کرونری، کارسینوم هپاتوسلولار، آلزایمر، ناباروری و سقط مکرر و ...

نتایج مطالعات در رابطه با ارتباط پلی مورفیسم های ژنی گیرنده های استروژنی و سقط مکرر در اقوام مختلف بسیار متفاوت است.

۱۸ سال پیش نقش ER α در سقط توسط Lehrer و همکاران بیان شد (۶۷).

در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۰ توسط Pineda و همکارانش در اسپانیا با موضوع آلل ها و هاپلوتیپ در گیرنده استروژنی آلفا در موقعیت های 397C/T- و 351A/G- و ارتباط آن ها با افزایش ریسک سقط صورت گرفت، بیان می کرد برخی از SNP^۱ های موجود در ژن گیرنده استروژن آلفا با سقط مکرر در ارتباط است. در حالی که نتوانستند ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم ژن گیرنده استروژن بتا در موقعیت های 1730 G / A و rs1256030 (T/C) و سقط مکرر پیدا کنند (۶۸).

در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۰۶ توسط Andrea Gerhardt و همکارانش در آلمان با موضوع بررسی پلی مورفیسم در ژن ER α در موقعیت IVS1-401 صورت گرفت، مشخص شد احتمال از دست دادن جنین در زنانی که حامل پلی مورفیسم خاصی در ژن ER α هستند، افزایش می یابد (۶۹).

¹ - Single Nucleotide Polymorphism

مطالعه ای که در سال ۲۰۰۸ توسط Aléssio و همکارانش بر روی زنان نژاد بومی برزیلی و زنان نژاد قفقازی مقیم برزیل صورت گرفت، بیان می نمود پلی مورفیسم ژن گیرنده استروژن آلفا در دو موقعیت، - 397C/T و 351A/G-، با سندرم سقط مکرر در ارتباط نمی باشد. آن ها همچنین نتوانستند ارتباط معنی داری بین موقعیت های 1082G / A و 1730 G / A و RPL نشان دهند. این تحقیق همچنین بیان می نمود که، در قومیت های متفاوت تاثیرات این پلی مورفیسم ها می تواند متفاوت باشد (۷۰). در مطالعه ی دیگری که در سال ۲۰۱۰ توسط Hanna و همکارانش بر روی زنان کانادایی صورت گرفت، نتوانستند چنین ارتباطی را به اثبات برسانند، اگرچه این گروه معتقد بودند، با افزایش جمعیت مورد مطالعه، امکان تغییر نتایج وجود دارد (۷۱).

در تحقیق دیگری که در سال ۱۹۹۴ توسط Berkowitz و همکارانش با موضوع بررسی پلی مورفیسم در ژن ER و افزایش احتمال سقط مکرر انجام گرفت، بیان شد، اگرچه پلی مورفیسم ها در گروه RPL ها وجود دارند، ولی نمی توانند به عنوان عامل اصلی در سقط در نظر گرفته شوند (۷۲).

مطالعه ای که اخیراً و در سال ۲۰۱۲ توسط Hu و همکارانش بر روی زنان چینی صورت گرفته است، نتوانست ارتباط معنی داری بین دو پلی مورفیسم موقعیت 1082G / A و 1730 G / A که بر روی ژن ESR2 واقع شده اند، را نشان دهد (۷۳).

در رابطه با موضوع مورد بررسی ما تا کنون مطالعات کمی صورت گرفته و نتایج آن ها در جمعیت های مختلف متفاوت می باشد. مطالعه حاضر برای اولین بار در کشور عزیزمان ایران صورت گرفته است.

فصل دوم

مولد و روش ها

جهت تعیین پلی مورفیسم ژنی گیرنده های استروژن در سندرم سقط مکرر مراحل زیر به ترتیب انجام شد:

۱- نمونه گیری از بیماران و زنان نرمال

۲- تخلیص DNA

۳- PCR و RFLP

۴- تحلیل آماری

۲-۱- دستورالعمل ها

مطالعه حاضر از نوع موردی- شاهدی^۱ می باشد. در این مطالعه، از نمونه خون، ۱۶۲ زن مبتلا به سندرم سقط مکرر خودبخودی (داشتن سابقه حداقل سه یا بیشتر) که به مرکز فوق تخصصی درمان ناباروری و سقط مکرر ابن سینا مراجعه کرده بودند، استفاده شد. معیار خروج از مطالعه وجود ناهنجاری های آناتومیک، اختلالات ساختار رحمی و بیماری های عفونی می باشد. همچنین، از نمونه خون، ۷۴ خانم بدون سابقه سقط و دارای حداقل دو باروری موفق (به منظور حذف موارد سقط مکرر ثانویه)، از میان زنانی که خواهان تولد نوزاد با جنسیت مشخص بوده اند، به عنوان گروه شاهد، استفاده شد.

۲-۲- استخراج DNA

در این تحقیق، بعد از نمونه گیری، از روش Salting out برای استخراج DNA استفاده شد.

۲-۲-۱- مواد، محلول‌های لازم برای استخراج DNA :

- ✓ Na₂EDTA (C₁₀H₁₄N₂Na₂O₂, H₂O, Plus one, Sweden, No 17-1324-01)
- ✓ Tris-HCl ((CH₂OH)₃ CNH₂, HCL, USB, USA, No 22676)
- ✓ اسید کلریدریک (Hcl, Mojallali Chemical Laboratories, Iran)
- ✓ هیدروکسید سدیم (NaOH, Merck, Germany, No 106482)
- ✓ آب مقطر دو بار تقطیر استریل
- ✓ SDS (C₁₂H₂₅OSO₃Na, Plus one, Sweden, No 17-1313-01)
- ✓ پروئیناز K (QIAGEN, USA, No19131)
- ✓ کلرید سدیم ۵ مولار (NaCl, M=58.44, Merck, Germany)
- ✓ ایزوپروپانول (CH₃CH(OH)CH₃, M:60.1, Merck, Germany)
- ✓ اتانول ۹۶٪ (CH₃CHOH 96%, M:46.07, Merck, Germany)
- ✓ میکروتیوب 1.5ml (Trefflab, Germany)
- ✓ لوله های فالکون ۱۵ میلی لیتری
- ✓ دستگاه ورتکس (VELP, Italy)
- ✓ سمپلر متغیر (0.5-10 ml و 10-100 و 100-1000) (Eppendorf, Germany)
- ✓ دستگاه سانتریفیوژ یخچالدار (Eppendorf, Germany)
- ✓ اسپکتوفتومتر (PicoDrop, England)
- ✓ بن ماری (Memert, Germany)

۲-۲-۲- تهیه محلول های مورد نیاز:

✓ بافر TES [Tris-EDTA-Salt, pH=7.5-8]

برای تهیه بافر TES ابتدا محلول های زیر تهیه شد:

✓ EDTA (0.5M, pH=8)

۱۸۶/۱۲ گرم پودر EDTA داخل ۱ لیتر آب مقطر استریل حل کرده و pH محلول را با NaOH به ۸ می رسانیم تا EDTA به طور کامل حل شود.

✓ Tris-Hcl (1M, pH=7.4-8)

۱۴/۱۲۱ گرم از کریستال Tris-Hcl را داخل آب مقطر استریل حل کرده و سپس pH محلول با Hcl تنظیم گردید.

✓ تهیه TES بصورت زیر می باشد:

۳۰ میلی لیتر از ۵M NaCl، ۲۰ ml از ۰.۵M EDTA و ۱۰ ml از 1M Tris-Hcl مخلوط کرده و حجم نهایی محلول با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. pH محلول با 1M Hcl بر روی عدد ۷/۴-۸ تنظیم گردید.

✓ بافر TE (1X, pH=8):

مقدار ۱۰ ml از 1M Tris-Hcl را با ۲ ml از ۰.۵M EDTA مخلوط کرده و حجم نهایی محلول با آب مقطر استریل به ۱ لیتر رسانده شد.

۲-۳- روش استخراج

مراحل استخراج به صورت زیر انجام شد:

- ۱- ۵ میلی لیتر خون گرفته شده از هر فرد را به فالكون حاوی ماده ضدانعقاد EDTA انتقال داده شد.
- ۲- خون تا فراهم شدن مقدمات سرد نگه داشته شد (استخراج در ۲۴ ساعت اول توصیه می شود).
- ۳- سانتریفیوژ خون با دور ۱۴۰۰g و به مدت ۵ دقیقه.
- ۴- سوپرناتانت ایجاد شده را دور ریخته و رسوب آن که حاوی گلبول های سفید (Buffy coat) و گلبول های قرمز باقی می ماند.
- ۵- اضافه کردن ddW برابر با حجم رسوب، به منظور لیز RBCها.
- ۶- سانتریفیوژ خون با دور ۱۴۰۰g و به مدت ۱۰ دقیقه.
- ۷- سوپرناتانت را دور ریخته و به رسوب باقی مانده به مقدار ۵-۶ میلی لیتر آب مقطر سرد اضافه گردید و ورتکس انجام شد.
- ۸- سانتریفیوژ خون با دور ۱۴۰۰g و به مدت ۱۰ دقیقه.

- ۹- مراحل ۷ و ۸ تکرار شود تا رسوب صورتی کم رنگ ظاهر گردد.
- ۱۰- به رسوب فوق مقدار $300 \mu\text{l}$ از بافر TES اضافه گردید، خوب تکان داده شد تا کاملاً حل شود، سپس به آن $250 \mu\text{l}$ SDS ۱۰٪ و $8 \mu\text{l}$ از پروتئیناز K (10 mg/ml) اضافه گردید و به آرامی تکان داده شد.
- ۱۱- بن ماری به مدت ۲ ساعت 37°C یا ۲۴ ساعت 56°C .
- ۱۲- به نمونه مورد نظر $2000 \mu\text{l}$ کلرید سدیم ۵ مولار اضافه گردید و به آرامی تکان داده شد و سپس با دور 1400 g و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد، سپس سوپرناتانت باقی مانده به لوله جدیدی منتقل گردید و رسوب دور ریخته شد.
- ۱۳- مقدار 4 ml ایزوپروپانول به هر لوله اضافه گردید و محلول به آرامی تکان داده شد تا کلاف DNA ظاهر گردد.
- ۱۴- مشاهده کلاف DNA و انتقال آن به همراه کمی از محلول به یک میکروتیوب استریل و سانتریفیوژ آن با دور 1400 g و به مدت ۱۰ دقیقه.
- ۱۵- مایع رویی را دور ریخته و روی رسوب (DNA Pellet) حدود $500-200 \mu\text{l}$ اتانول ۷۰٪ اضافه گردید، و به مدت ۱ دقیقه با دور 1400 g سانتریفیوژ شد.
- ۱۶- مایع رویی را دور ریخته و میکروتیوب تا تبخیر مایع باقی مانده در محیط آزمایشگاه نگاه داشته شد، سپس به آن بافر TE یا آب دو بار تقطیر استریل اضافه شد (حجم بافر TE یا آب مقطر بستگی به مقدار DNA دارد و از $10 \mu\text{l}$ تا $200 \mu\text{l}$ متغیر می باشد). DNA های استخراج شده تا زمان انجام PCR در 20°C - نگهداری شدند.

"

"

"

"

۲-۳- الکتروفورز روی ژل آگارز:

به طور کلی حرکت ذرات باردار تحت تاثیر میدان الکتریکی را الکتروفورز می نامند. در این فرآیند خصوصیات فیزیکوشیمیایی مولکول ها (اندازه، شکل و میزان بار الکتریکی)، شرایط محیطی (قدرت یونی، pH و درجه حرارت) و فاکتورهای الکتریکی (اختلاف پتانسیل و شدت جریان) موثر هستند. اسیدهای نوکلئیک در pH=8 بار منفی دارند و تحت تاثیر میدان الکتریکی به سمت قطب مثبت حرکت می کنند. جداسازی مولکول های اسیدنوکلئیک در محیط پایه ژل آگارز بر اساس تفاوت وزن مولکولی از یکدیگر جدا می شوند.

محصولات PCR بوسیله الکتروفورز روی ژل آگارز، در حضور شاهد مناسب تفکیک شده و بعد از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید توسط تاباندن اشعه ماوراء بنفش به ژل و انعکاس درخشش فلوئورسانس قابل مشاهده می گردد.

۲-۳-۱- مواد و وسایل مورد نیاز الکتروفورز:

- ✓ Tris-base (NH₂C(CH₂OH)₃, Plusone, Sweden)
- ✓ استیک اسید گلایسال (CH₃COOH, Merck, Germany)
- ✓ Na₂EDTA (C₁₀H₁₄N₂Na₂O₂, H₂O, Plus one, Sweden, No 17-1324-01)
- ✓ گلیسرول (C₃H₈O₃, , Merck, Germany , No 4091)
- ✓ آگارز (Invitrogen,)
- ✓ اتیدیوم بروماید (10mg/ml, Roche, Germany)
- ✓ مارکر VIII (PUC Mix Marker 8, Fermentas, Cat No. SM0301)
- ✓ تانک الکتروفورز افقی، قالب ژل و شانه مخصوص (BioRad, USA)
- ✓ دستگاه ترانس لومیناتور یا UV Doc (UVP, USA)

✓ (BioRad, USA) Casting tray

✓ سمپلر متغیر ۰/۵-۱۰ (Eppendorf, Germany)

✓ ترازو

۲-۳-۲- تهیه بافر TAE (50X) (Running Buffer):

برای تهیه بافر، ۱۲۱ گرم Tris-base و ۲۸/۵۵ ml اسید استیک گلیسار را با ۵۰ ml EDTA (0.5M) مخلوط کرده و حجم آن را با آب مقطر دیونیزه به ۵۰۰ ml می‌رسانیم = TAE (50X)

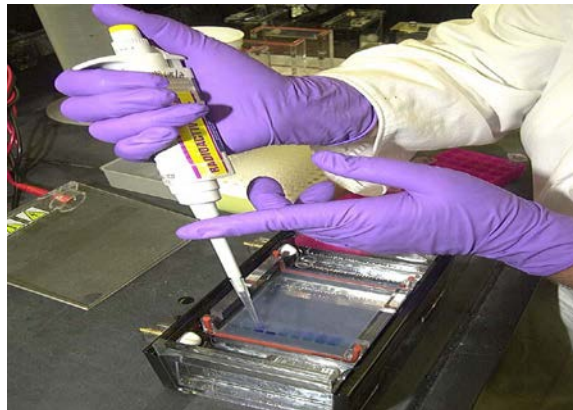
در هنگام استفاده به نسبت ۱/۵۰ رقیق می‌کنیم تا محلول TAE (1X) بدست آید.

۲-۴- آنالیز کمی و کیفی DNA

به منظور تعیین صحت استخراج، تمامی DNA های استخراج شده مورد آنالیز کیفی و کمی قرار گرفتند. در واقع ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده و تعیین غلظت و خلوص آن، نشان داد که کیفیت نمونه بدست آمده با روش‌های ذکر شده، جهت آزمایش PCR مناسب است. در برخی موارد ناخالصی‌هایی از مراحل مختلف، DNA را همراهی می‌کند که می‌توانند در روش‌های مولکولی دخالت کرده و این آزمایشات را با مشکل مواجه کنند.

۲-۴-۱- آنالیز کیفی DNA

مواد مورد نیاز: پودر آگارز، بافر TAE ($1\times$)، دستگاه الکتروفورز افقی همراه با لوازم جانبی برای ریختن ژل، اتیدیوم برماید 10mg/ml و دستگاه ژل داکيومنت. پس از استخراج DNA، با توجه به تعداد نمونه‌های استخراج شده، کاست‌های ژل آگارز ۱٪ آماده شد تا DNAهای استخراج شده مورد آنالیز کیفی قرار بگیرند. نحوه کار به این صورت بود که برای کاست ۷ تایی ۰/۳ گرم آگارز در 30 ml بافر $TAE\ 1\times$ و برای کاست ۲۱ تایی ۱/۸ گرم آگارز در 180 ml بافر $TAE\ 1\times$ با استفاده از حرارت یا در ماکروفر قرار داده و حل کرده و پس از افزودن مقدار مناسب اتیدیوم برماید (مقدار $2\text{ }\mu\text{l}$ برای حجم 180 ml بافر $TAE\ 1\times$) در کاست ریخته شد. و پس از سفت شدن، ژل برای الکتروفورز مورد استفاده قرار گرفت. الکتروفورز برای همه نمونه‌ها انجام شد (تصویر ۲-۱).



تصویر ۲-۱: الکتروفورز برای تعیین آنالیز کیفی DNA

۲-۴-۲- آنالیز کمی DNA

وسایل مورد نیاز: دستگاه اسپکتوفتومتر (Picodrop, UK)، سمپلر P2 (Gilson, France)، سر سمپلر مخصوص UV Pette (Picodrop, UK)، آب دو بار تقطر استریل یا بافر TE (بافری که با استفاده از آن نمونه های DNA را رقیق کرده ایم) که با استفاده از آن نمونه های DNA را رقیق شده است به منظور بلانک کردن دستگاه.

اسپکتوفتومتر با استفاده از طول موج ماورای بنفش می تواند، مقدار و خلوص اسید نوکلئیک استخراج شده را بررسی می کند.

- ✓ در این روش به سه طول موج ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر نیاز است.
- ✓ نمونه را به مقدار ۱/۵۰۰ یا ۱/۱۰۰۰ رقیق کرده و OD را در طول موج های فوق می خوانیم.
- ✓ روش کار به ترتیب زیر می باشد:

۱- استفاده از آب دیونیزه دوبار تقطیر یا TE به عنوان بلانک.

۲- خواندن OD_{260} به OD_{280} برای هر نمونه DNA

۳- خواندن غلظت DNA. (تصویر ۲-۲)

DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر جذب دارند و در این طول موج، مقدار آن برای DNA دو رشته ای، عبارت است از: $OD=1=50 \mu g/ml$

برای تعیین خلوص نمونه (OD)، از نسبت جذب نمونه در ۲۶۰ نانومتر تقسیم بر جذب در ۲۸۰ نانومتر استفاده می شود. این نسبت در مورد DNA بین ۱/۸-۲ می باشد.

چنانچه نسبت بدست آمده، پایین تر از این مقدار باشد، نشان دهنده وجود ناخالصی پروتئینی در نمونه است و اگر این نسبت بالاتر از ۲ باشد به منزله وجود RNA می باشد.

۵-۲- ژنوتایپ کردن نمونه‌ها (ژنوتایپینگ)

۵-۲-۱- انتخاب پرایمرهای مناسب برای هر موتاسیون

۵-۲-۱-۱- طراحی آغازگر

قواعد مشخصی برای اینکه بتوان با اطمینان یک جفت پرایمر موثر را انتخاب کرد، وجود ندارد. در حال حاضر پرایمر بیش از هر عامل دیگری عامل موفقیت یا شکست در یک واکنش تکثیری است. بعضی قواعد راهنمایی‌های مفیدی را در مورد طراحی آغازگر می‌کنند که ذیلاً به آنها اشاره شده است .

۱- طول متوسط هر پرایمر بین ۱۸-۳۰ جفت باز مناسب است. با طول پرایمر، کوچک اتصال غیراختصاصی افزایش یافته و با طول پرایمر بزرگتر، سرعت هیبریداسیون کاهش می‌یابد.

۲- مقدار G-C دو پرایمر Forward و Reverse با هم مشابه بوده و حدود ۵۰-۶۰ درصد باشد.

۳- آغازگرها را باید از نظر مکمل بودن با هم کنترل شوند^۱. تا از تشکیل پرایمر دایمر جلوگیری شود.

پرایمر دایمر یک تکثیر مصنوعی است که اغلب در محصول PCR مشاهده می‌شود و عبارت است از یک قطعه‌ی دو رشته‌ای که طول آن تقریباً به مجموع دو پرایمر نزدیک است و هنگامی مشاهده می‌شود که یک پرایمر توسط آنزیم پلیمراز به روی پرایمر دیگر گسترش یابد. مکانیزم واقعی که چگونه پرایمر دایمر تشکیل می‌شود بدرستی مشخص نیست. پرایمرها با انتهای مکمل ^{30}C مستعد تشکیل دایمر هستند. ضعف در آنزیم Taq باعث پلیمریزاسیون مستقیم الگوی غیرهدف می‌شود. در هر حال چنانچه پرایمر دایمر بعنوان "مانعی مشاهده شود، می‌توان آن را تا حدودی با غلظت حداقل پرایمر و آنزیم کاهش داد .

۴- در انتهای ^{30}C پرایمر باید حداقل C یا G قرار گیرد. در توالی‌هایی پرایمرهایی که انتهای ^{30}C آنها غنی از G+C می‌باشد احتمال اتصال اشتباهی افزایش می‌یابد.

۵- باید تا حد امکان از توالی‌های پالیندرومیک داخل پرایمرها جلوگیری کرد.

۶- نسبت چهار نوکلئوتید در آغازگر حتی المقدور یکسان باشد.

۷- آغازگر به توالی تکرار شونده ختم نشود.

۸- دمای T_m دوپرایمر آغازگر^۲ نزدیک هم باشد.

^۱ Blast

^۲ Forward and Reverse

۹- حد مجاز دمای اتصال پرایمر طراحی شده باید بین ۵۵-۶۵ باشد. دمای تکثیر ایده آل ۶۲-۷۲ می باشد.

۱۰- درجه حرارتی که پرایمر به DNA الگو متصل می شود، به طول آغازگر و مقدار GC آن بستگی دارد. برای پرایمرهای حاوی 50% GC و دارای ۲۰ نوکلئوتید، دمای ۵۵ درجه سانتیگراد پیشنهاد می شود. برای افزایش اختصاصی عمل کردن آغازگر حتی ممکن است دماهای بالاتری هم مورد نیاز باشد.

برای اینکه هر پرایمر با رشته الگوی خودش هیبرید شود، لازم نیست که عینا و کاملا مکمل رشته الگو باشد. برای طراحی پرایمر اغلب از برنامه های کامپیوتری ویژه استفاده می شود. فاصله بین پرایمرهایی که با DNA هدف هیبرید می شود، بطور معمول کمتر از ۱۵ کیلو باز می باشد. در حقیقت یک کاهش اساسی در سنتز موثر هنگامی که محصول تکثیر متجاوز از ۱۰۰۰ باز می شود، مشاهده می گردد. به همین دلیل طول قطعه مورد تکثیر در PCR نباید بیش از ۳ کیلو باز باشد و حد مطلوب کمتر از ۱ کیلو باز می باشد. تکثیر قطعات بسیار طویل و بالای ۴۰ کیلو باز مقدور است، اما نیاز به روش های ویژه ای دارد.

۲-۱-۵-۲- مواقعی که پرایمرها مکمل DNA هدف (الگو) نباشند

۱- ARM's PCR: پرایمرهایی که برای ایجاد موتاسیون در یک ژن طراحی می گردند.

۲- Restriction creation: پرایمرهایی که سمت ۵' آنها جایگاه ۵ شناسایی آنزیم محدودگر تعبیه می شود تا بتوان محصول PCR را توسط آن آنزیم برش داد. این کار برای کلون کردن محصول PCR انجام می شود.

۳- پرایمرهایی که لازم است محصول PCR آنها دارای پروموتور باشد و برای بیان یک ژن کاربرد دارند، فاصله دو پرایمر باید کمتر از ۱۰ کیلوباز باشد (کارآیی همانند سازی برای محصول PCR بیش از ۳ کیلو باز کمتر است). بهتر است پرایمرها را بر حسب کاری که لازم داریم طراحی شوند.

۲-۱-۵-۳- دمای ذوب آغازگر

دمای اتصال باید بقدر کافی پایین باشد تا پرایمر و DNA الگو قادر به اتصال باشند و از سوی دیگر باید به قدر مناسب بالا باشد تا از تشکیل اتصالات غیراختصاصی جلوگیری کند. دمای اتصال از روی شاخصی

به نام درجه حرارت ذوب محاسبه می‌شود. دمای ذوب^۱ درجه حرارتی است که در آن نیمی از DNA به صورت تک رشته‌ای درآمده است. یکی از مهمترین مشخصات Tm وابستگی آن به ترکیب بازی DNA است. G و C سه پیوند هیدروژنی و بازهای آدنین و تیمین دو پیوند هیدروژنی دارند. بنابراین هر چقدر مقدار گوانین و سیتوزین در DNA بیشتر باشد، Tm بیشتر است. دمای ۱-۲ درجه سانتیگراد کمتر از Tm کافیست که هیبریداسیون بین پرایمر و DNA ی الگودر آن صورت گیرد. دمای ذوب بطور معمول از طریق فرمول ساده ی زیر نیز محاسبه می‌شود.

$$Tm = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$$

دو پرایمر باید طوری طراحی شوند که دارای Tm یکسان باشند، در غیر اینصورت در حرارت مناسب برای یک پرایمر برای جفت دیگر نامناسب خواهد بود. بسیاری از آزمایشگاهها دمای چسبیدن را از ۳-۵ درجه سانتیگراد زیر دمای ذوب (Tm) که طریق این فرمول محاسبه شده‌است در نظر می‌گیرند. از این موضوع نتیجه گرفته می‌شود که پرایمرهای با طول زیاد باعث افزایش بالا رفتن اختصاصی بودن واکنش نمی‌شود.

۲-۵-۱-۴- غلظت پرایمرها و روش اندازه‌گیری آن

غلظت پرایمر بین ۰/۵ تا ۱/۵ میکرومول و حد مطلوب ۰/۶-۰/۱ برای یک واکنش ۲۵ میکرولیتری می‌باشد. غلظت بالای پرایمر باعث بسط غیراختصاصی و پرایمر-دایمر می‌شود. برای ساختن محلول کار پرایمر، دانستن وزن مولکولی پرایمر لازم است، که با استفاده از فرمول زیر به دست می‌آید:

$$M.W = (A.312) + (C.288) + (G.328) + (T.303) - 61$$

A، C، G و T تعداد نوکلئوتیدها در قطعه‌ی پرایمر هستند. با تقسیم مقدار غلظت پرایمر بر حسب گرم در لیتر بر وزن مولکولی پرایمر، غلظت آن بر حسب میکرومولار به دست می‌آید. البته وزن مولکولی پرایمرها و همچنین OD آن توسط شرکت‌های سازنده ارائه می‌شود.

¹ Temperature Melting (Tm)

اتصال پرایمر : دما و مدت زمان لازم برای اتصال پرایمر به : (۱) طول پرایمر ، (۲) ترکیب نوکلئوتید و (۳) غلظت پرایمر بستگی دارد. با توجه به طیف فعالیت آنزیم *Taq* پلی‌مراز که در محدوده ۵۸-۷۰ درجه سانتیگراد می‌باشد دمای اتصال در محدوده ۵-۷۲ درجه سانتیگراد بطور معمول بهترین نتیجه را می‌دهد. افزایش دمای اتصال بسط غیراختصاصی را در انتهای 30°C پرایمر کاهش می‌دهد. دمای پایین، تکثیر همراه با غلظت اختصاصی بودن واکنش را کاهش می‌دهد.

بسط پرایمر : مدت زمان بسط بستگی به عوامل: (۱) طول توالی هدف ، (۲) غلظت توالی هدف و (۳) دمای تکثیر دارد. بسط پرایمر بطور معمول در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام می‌شود یک زمان بسط یک دقیقه‌ای در ۷۲ درجه سانتیگراد برای فرآورده‌های معادل ۲ کیلو باز کافیت.

برای هر موتاسیون، پرایمر مناسب جهت ژنوتایپ کردن هر نمونه DNA از طریق واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز^۱ و چند شکلی در طول قطعات محدود^۲ انتخاب می‌شود. این پرایمر های انتخاب شده بوسیله نرم افزارهای بیوانفورماتیکی و Gene Runner مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. در این بررسی با Blast کردن پرایمرها از لحاظ شناسایی صحیح موقعیت و همچنین عدم Miss Match بررسی می‌شود (تصویر ۲-۳).

1 - Polymerase Chain Reactions(PCR)

2 - Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP)

Primer-BLAST *Primer-Blast results*

NCBI/Primer-BLAST : results: Job id=JSID_01_461033_130.14.18.128_9002 [more...](#)

Input PCR template none
Specificity of primers Target templates were found in selected database: Genome database (reference assembly only) for selected species (Organism limited to Homo sapiens)
Other reports [Search Summary](#)

▼ **Detailed primer reports**

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TTGCGCAGCTTAACCTCAAA	20	56.85	40.00	6.00	2.00
Reverse primer	ACCTGTCCAGAACAGATCT	20	55.77	45.00	6.00	6.00

Products on target templates

>NT_026437.12 Homo sapiens chromosome 14 genomic contig, GRCh37.p5 Primary Assembly

product length = 321
 Features associated with this product:
[estrogen receptor beta isoform 2](#)
[estrogen receptor beta isoform 2](#)

Forward primer 1 TTGCGCAGCTTAACCTCAAA 20
 Template 45724262 45724243
 Reverse primer 1 ACCTGTCCAGAACAGATCT 20

تصویر ۲-۳: با استفاده از Primer-Blast(NCBI) می توان پرایمرها را از لحاظ شناسایی صحیح موقعیت و همچنین عدم Miss Match مورد تأیید قرار داد. همچنین در این قسمت درصد گوانین- سیتوزین (GC%) و مقدار Self complementary ها و Tm پرایمرها مشخص می شود.

جدول ۱-۲: توالی جفت پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش.

نام ژن	پلی مورفیسم	توالی پرایمر	محصول PCR (bp)	آنزیم محدود کننده	محصول RFLP
ESR1	rs2234693 (C/T) rs9340799 (A/G)	F:GATATCC AGGGTTATGTGGCA R:AGGTGTTGCCTATTATATTAACCTTG A	346bp	PvuII AND XbaI	243+103 198+148
	"rs1256030 (C/T)	F:CAATGCATATCCTGCCTGTG R:TCCCGGAAATCTGATACAGC "	"251bp	"AluI	147+80+ 24
	"rs4986938 (G/A)	F: GGTTTAGGGGTGGGGTAGACTG R: GTGGAGGGAAGGATGGTACA "	"442bp	"AluI	336+106
ESR2	"rs1256049 (G/A)	F:TTGCGCAGCTTAACCTCAAA R:ACCTGTCCAGAACAAAGATCT "	"321bp	RsaI "	211+110

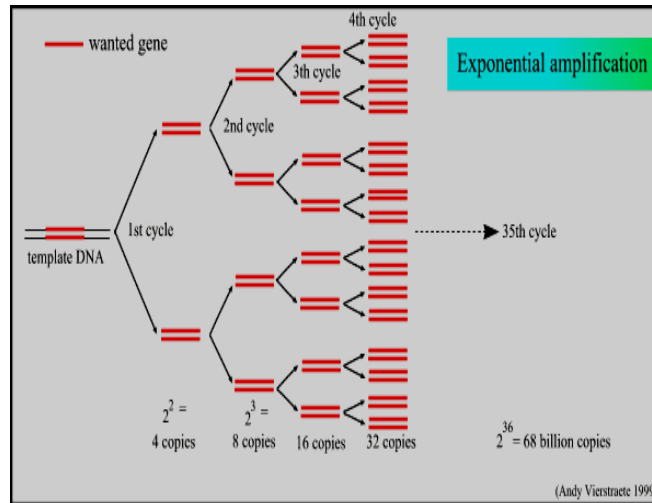
"

۲-۶- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز^۱

این روش توسط میولیس Mullis در سال ۱۹۸۶ ابداع شد که اساس این روش مشابه همانندسازی DNA در داخل بدن موجود زنده است. تا قبل از ابداع این روش، تنها روش برای مطالعه ساختمان نوکلئوتیدها و ژن‌های مختلف استفاده از تکنیک کلونینگ بود که در این روش موجود دیگری به جز موجود اول مورد بررسی قرار می‌گرفت که این موجود دوم معمولاً باکتری E.Coli بود. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به منظور ایجاد مقادیر نامحدود از یک توالی مورد نظر می‌باشد. PCR می‌تواند یک مولکول منفرد از DNA را چندین بلیون بار در مدت چند ساعت افزایش دهد و این روش هم در

تشخیص مولکولی و هم در آنالیز مولکولی بیماری‌های ژنتیکی انقلابی به وجود آورده است (تصویر ۲-۴). PCR یک روش بسط آنزیمی یک قطعه از DNA (قطعه هدف) است که بین دو بخش الیگونوکلوئوتیدی قرار دارد.

این بخش‌ها چنان طراحی شده‌اند که یکی از آنها مکمل یک رشته از مولکول DNA در یک سمت توالی هدف بوده و دیگری مکمل رشته دیگر مولکول DNA در سمت مخالف توالی هدف می‌باشد. از آنجایی که انتهای ۳' هر کدام، از الیگونوکلوئوتیدها به سمت توالی هدفی که باید بسط یابد قرار دارد و این قطعات آغازین در جوانب توالی هدف قرار دارند، قطعات آغازین^۱ در اثر سنتز توالی بین آنها توسط DNA پلی-مرز کشیده می‌شوند. قطعات آغازین چنان ترتیب یافته‌اند که دو رشته جدید DNA را که خودشان مکمل بوده و لزوماً یک نسخه دوم از توالی هدف اولیه ایجاد می‌کنند را پر می‌نمایند. چرخه‌های تکراری دناتوراسیون حرارتی، هیبریداسیون پرایمرها و سنتز آنزیمی DNA منجر به بسط نهایی توالی هدف DNA می‌شود (تصویر ۲-۴). امروزه یکی از متداول‌ترین روش‌های ژنوتیپ کردن استفاده از PCR و RFLP است. با توجه به محل SNP در یک ژن می‌توان با طراحی یک جفت پرایمر مناسب، قطعه‌ای از ژن که می‌تواند حاوی SNP باشد، به روش PCR تکثیر کرد و سپس به کمک تغییر در محل شکست آنزیم محدود کننده در اثر SNP، به روش RFLP، وجود یا عدم وجود SNP را در طول قطعه ژن تشخیص داد. پس از انتخاب جفت پرایمر مناسب به منظور ژنوتایپ کردن هر نمونه برای هر کدام از پلی مورفیسم‌ها، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز به منظور تکثیر قطعه ژن حاوی ناحیه موتاسیون برای هر جفت پرایمر بهینه سازی می‌شود.



+

شکل ۲-۴: نحوه تکثیر DNA به روش PCR

جدول ۲-۲: برنامه PCR بهینه سازی شده برای هر جفت پرایمر.

مرحل PCR پرایمر	تعداد سیکل	دنا تورا سیون اولیه دما (C) و مدت (sec)	دنا تورا سیون دما (C) و مدت (sec)	اتصال دما (C) و مدت (sec)	طویل سازی دما (C) و مدت (sec)	طویل سازی نهایی دما (C) و مدت (sec)	میزان MgCl ₂ برای هر Mastermix (1ml)
rs2234693 (C/T) rs9340799 (A/G)	35	95C, 5min	95C, 30sec	60C, 30sec	75C, 42sec	75C, 5min	1.5mM
rs1256030 (C/T)	36	95C, 5min	95C, 30sec	50C, 30sec	75C, 42sec	75C, 5min	1.5mM
rs4986938 (G/A)	35	95C, 5min	95C, 30sec	59C, 30sec	72C, 30sec	72C, 5min	1.5mM
rs1256049 (G/A)	35	95C, 5min	95C, 30sec	55C, 30sec	72C, 23sec	72C, 5min	1.5mM

صحت انجام PCR با انجام الکتروفورز برای محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ پس از رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید زیر نور UV تائید شد.

۲-۷- مواد و تهیه ژل آگارز

۲-۷-۱- مواد و محلول های لازم برای الکتروفورز ژل آگارز

۱- پودر آگارز

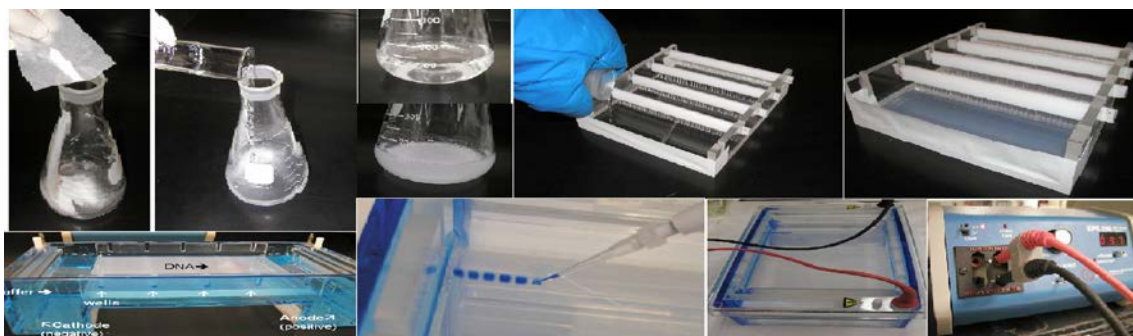
۲- محلول TAE (Tris base Acetic acid Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid)

۳- محلول اتیدیوم بروماید ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر

۴- مارکر وزن مولکولی DNA متناسب با طول قطعه محصول PCR

۲-۷-۲- نحوه تهیه ژل آگارز ۱/۵٪

حجم ژل آگارز، با توجه به اندازه تانک الکتروفورز تعیین می‌شود. برای یک تانک متوسط، تهیه حجم ۷۰ سی‌سی ژل آگارز، ۱/۰۵ گرم از پودر آگارز را با ۷۰ سی‌سی محلول TAE (1X) در ارلنی مخلوط و پس از حرارت دادن و حل کامل پودر آگارز در محلول، پس از کمی سرد شدن، ۰/۵ میکرولیتر از محلول اتیدیوم بروماید به آن اضافه کرده و پس از توزیع یکنواخت آن، محلول را در قالب شانه گذاری شده تانک الکتروفورز می‌ریزیم. پس از بسته شدن کامل ژل، شانه‌ها را از قالب خارج کرده و ژل را به تانک الکتروفورز منتقل و تانک با محلول TAE (1X) پر می‌شود، به طوری که کاملاً روی ژل را بپوشاند. سپس در هر چاهک از محصول PCR (۵ میکرولیتر) لود می‌شود. در یکی از چاهک‌ها مارکر وزن مولکولی مناسب لود می‌شود که امکان بررسی و تایید قطعه با توجه به طول باند وجود داشته باشد. سپس تانک الکتروفورز را به دستگاه مولد برق متصل و دستگاه بر روی ولتاژ ۸۰ ولت تنظیم می‌شود (۱۰ ولت در هر سانتی‌متر). پس از طی زمان لازم، دستگاه مولد برق را قطع و ژل را به دستگاه UV Trans illuminator (ژل داکيومنت) برای رویت باندها انتقال می‌دهیم (تصویر ۲-۵).



تصویر ۲-۵: مراحل تهیه ژل آگارز الکتروفورز

۸-۲- چندشکلی در طول قطعات محدود^۱

آنزیم‌های محدود کننده توالی‌های شناسایی ویژه‌ای در DNA دارند و در نتیجه تغییرات توالی در DNA ژنومی منجر به ایجاد یا حذف محل‌های شکسته شدن ویژه‌ای می‌شوند و لذا اندازه یک یا بیشتر قطعات DNA را تغییر می‌دهند. آنزیم‌های این مطالعه بوسیله نرم افزار بیوانفورماتیک در سایت NEB Cutter بررسی می‌شوند (تصویر ۲-۶).

تنوعات موجود بر پایه DNA در محل‌های محدودکننده چندشکلی در طول قطعات محدود RFLP نامیده می‌شوند. RFLP ها ممکن است بیشتر از یک قطعه از یک تغییر نوکلئوتیدی منفرد، از حذف یا الحاق ناشی شود. اگر یک قطعه از DNA بین دو محل محدود کننده دچار حذف یا اضافه شود، اندازه قطعه محدود کننده حاصل متفاوت خواهد بود. RFLP های ناشی از تغییرات در محل‌های شکسته شدن اندونوکلاز محدودکننده ویژه، یک زیرگروه کوچک از طبقه کلی تر پلی مورفایسم هستند که پلی-مورفایسم‌های نوکلئوتید منفرد^۲ (SNPs) نامیده می‌شوند. SNP ها به طور یکنواخت و شایعی در تمامی ژنوم منتشر هستند. این مشخصات آنها را نشانگرهای بسیار عالی ژنتیکی برای تشخیص مولکولی می-کنند.

¹ Restriction Fragment Length Polymorphisms RFLP

² Single nucleotide polymorphism (SNP)

۲-۸-۱- روش انجام RFLP بر روی محصولات PCR

به منظور RFLP بر روی محصول PCR هر جفت پرایمر، از آنزیم محدودالایتر^۱ (RE) و بافر (10X) مناسب آن و میزان مناسبی از محصول PCR استفاده می شود.

۱- بافر (مناسب هر آنزیم) (10X) : 2 μ l

۲- محصول PCR: 8 μ l

۳- آنزیم محدودالایتر 2 unit

۴- آب مقطر دیونیزه دو بار تقطیر : 9 μ l

* حجم نهایی 20 μ l

برای بررسی نتیجه RFLP، از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز برای مقایسه دقیق طول باندها استفاده شد. با توجه به نتایج مشاهده شده بر روی ژل آگاروز، ژنوتیپ هر فرد برای هر پلی مورفیسم مشخص شد.

۲-۹- روش های آماری مورد استفاده

اطلاعات بدست آمده توسط نرم افزار SPSS 13.0 بررسی شد. چگونگی وقوع این پلی مورفیسم به سه حالت نرمال، هتروزیگوت و هموزیگوت در دو گروه بیمار و شاهد با استفاده از آزمون Chi-square و Fischer exact test بررسی شد. نتایج با $p\text{-value} < 0.05$ معنی دار تلقی گردیدند. سپس با ادغام دو گروه هموزیگوت و هتروزیگوت، گروه جدیدی ایجاد شد. جهت بررسی اثر هر پلی مورفیسم بر وقوع سقط مکرر از مدل رگرسیون لجستیک یک متغیره استفاده شد. سپس جهت بررسی اثر همزمان موتاسیون ها بر شانس وقوع سقط مکرر از مدل رگرسیون لجستیک چندگانه به روش پس رو بکار رفت.

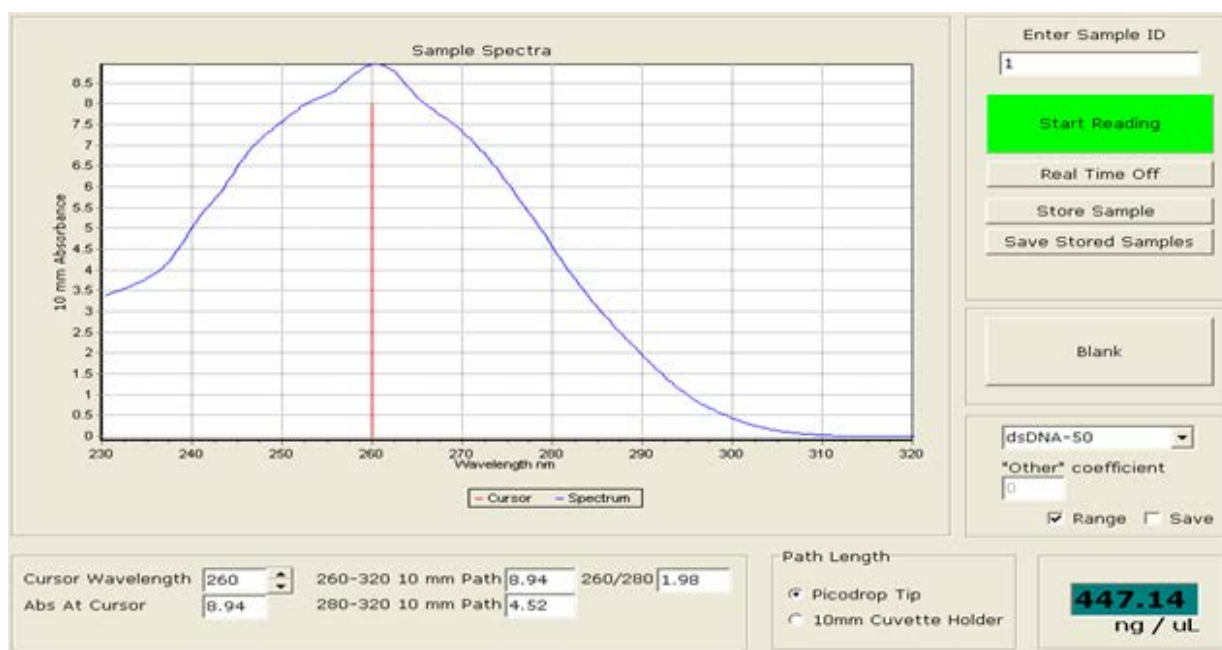
¹ - Restriction Enzyme(RE)

فصل سوم

نتایج

۱-۳- بررسی کمی و کیفی DNA استخراج شده

بعد از استخراج DNA و به منظور بررسی کمی DNA استخراج شده، آنالیز اسپکتروفوتومتری انجام شد تا از غلظت آنها اطمینان حاصل شود. این کار با دو هدف صورت می گیرد: اولاً از جهت اینکه در هر میکرولیتر چند نانوگرم DNA وجود دارد، ثانیاً خلوص DNA مشخص شود. سپس با اندازه گیری OD در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر مقدار DNA محاسبه شد. متوسط میزان جذب DNA که توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر برای نمونه های نوکلئیک اسید استخراجی خوانده شد به شرح زیر می باشد (شکل ۱-۳، جدول ۱-۳)



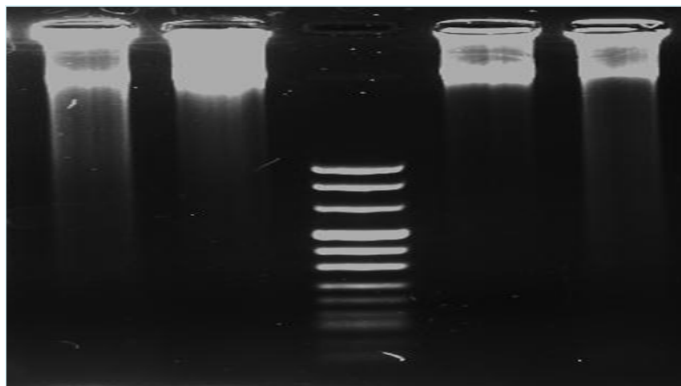
شکل ۱-۳: بررسی غلظت DNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفوتومتر (نانودراپ)

جدول ۱-۳: بررسی کمی DNA

نتایج بررسی کمی DNA	
غلظت DNA	۲۳۴ ng/μl
نسبت 260/280 nm	۱/۷۸
نسبت 260/230 nm	۱/۵۱
جذب در طول موج 260 nm	۰/۱۵۴
جذب در طول موج 280 nm	۰/۱۲۳
جذب در طول موج 230 nm	۰/۱۳۴

همانطور که مشاهده شد میزان جذب در طول موج 260/280 nm بالای ۱/۵ بوده که نشان دهنده این است که نمونه DNA تقریباً عاری از پروتئین است و جذب 260/230 nm هم بالای ۱ بوده که در این صورت میزان کربوهیدرات در نمونه DNA بسیار پایین و تقریباً صفر است.

به منظور تایید کیفی DNA تخلیص شده، الکتروفورز نمونه بر روی ژل آگارز انجام شد. بعد از الکتروفورز نمونه ها روی ژل آگارز ۱٪، در تمام نمونه ها تک نوار مشاهده شد و نتایج نشان دهنده کیفیت بسیار خوب DNA استخراج شده بود (شکل ۲-۳)



شکل ۲-۳: الکتروفورز نمونه های DNA بر روی ژل آگارز ۱٪.

۲-۳- انتخاب پرایمرهای مناسب

برای هر پلی مورفیسم با شرایطی که در فصل ۲ بحث شد، یک جفت پرایمر طراحی شد (جدول ۲-۲).

سپس بعد از انجام PCR، RFLP با آنزیم های محدودالایر انجام شد (جدول ۲-۳)

جدول ۲-۲: توالی جفت پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش.

نام ژن	پلی مورفیسم	توالی پرایمر	محصول PCR (bp)	آنزیم محدودکننده	محصول RFLP
ESR1	rs2234693 (T/C)	F:GATATCC AGGGTTATGTGGCA R:AGGTGTTGCCTATTATATTAACC TTGA	346bp	PvuII	243+103
	rs9340799 (A/G)			AND XbaI	198+148
ESR2	rs1256030 (T/C)	F: CAATGCATATCCTGCCTGTG R: TCCCGGAAATCTGATACAGC "	"251bp	"AluI	147+80 +24
	rs4986938 (G/A)	F: GGTTTAGGGGTGGGGTAGACTG R: GTGGAGGGAAGGATGGTACA "	"442bp	"AluI	336+106
	rs1256049 (G/A)	F:TTGCGCAGCTTAACTTCAAA R:ACCTGTCCAGAACAAGATCT "	"321bp	RsaI "	211+110

جدول ۲-۳: جایگاه برش آنزیم های مورد استفاده.

جایگاه برش	آنزیم های محدودالایر
CAG [▼] CTG	PvuII
T [▼] CTAG A	XbaI
GT [▼] AC	RsaI
AG [▼] CT	AluI

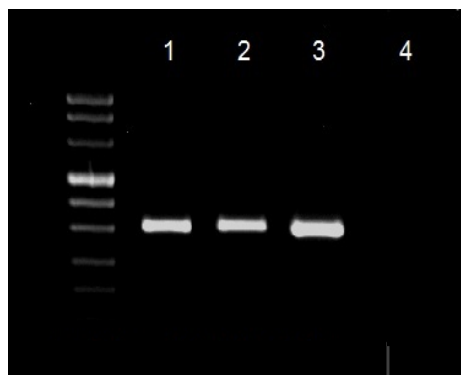
۳-۳- نتایج PCR

پس از انتخاب پرایمرها، برنامه PCR برای هر جفت پرایمر بهینه سازی شد. بدین معنا که تعداد سیکل، زمان Ta^۱ و میزان MgCl₂ مناسب برای هر برنامه PCR برای هر جفت پرایمر تعیین شد (جدول ۳-۳).

جدول ۳-۳: برنامه PCR بهینه سازی شده برای هر جفت پرایمر.

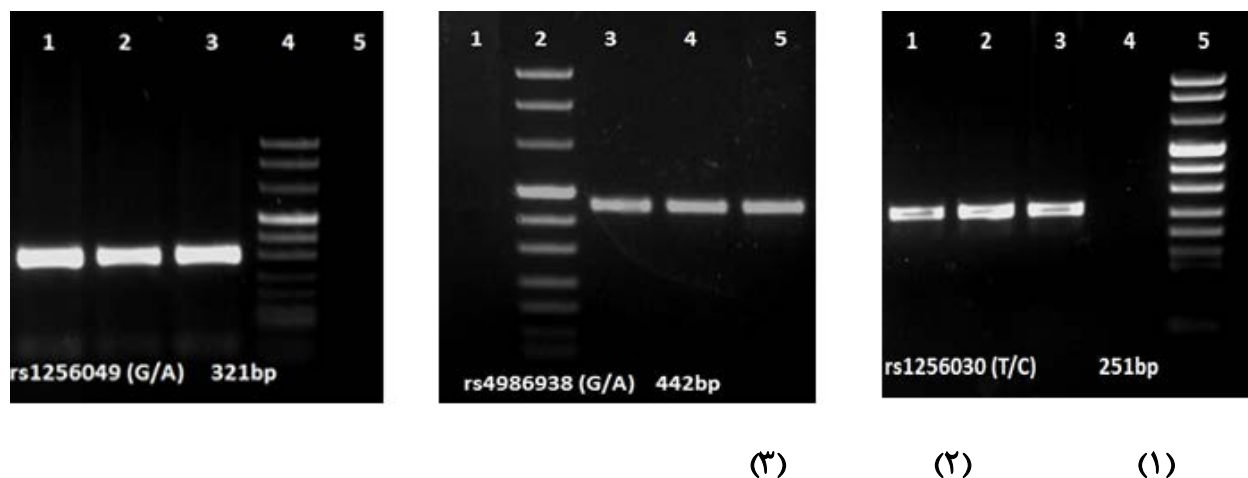
میزان MgCl ₂ برای هر Mastermix (1ml)	طول سازی نهایی دما (C) و مدت (sec)	طول سازی دما (C) و مدت (sec)	اتصال دما (C) و مدت (sec)	دنا تورا سیون دما (C) و مدت (sec)	دنا تورا سیون اولیه دما (C) و مدت (sec)	تعداد سیکل	مرحل PCR پرایمر
1.5mM	75C, 5min	75C, 42sec	60C, 30sec	95C, 30sec	95C, 5min	35	rs2234693 (C/T) rs9340799 (A/G)
1.5mM	75C, 5min	75C, 42sec	50C, 30sec	95C, 30sec	95C, 5min	36	rs1256030 (T/C)
1.5mM	72C, 5min	72C, 30sec	59C, 30sec	95C, 30sec	95C, 5min	35	rs4986938 (G/A)
1.5mM	72C, 5min	72C, 23sec	55C, 30sec	95C, 30sec	95C, 5min	35	rs1256049 (G/A)

پس از بهینه سازی برنامه PCR برای هر جفت پرایمر، برای ۲۴۹ نمونه بیمار و ۱۰۵ نمونه کنترل PCR انجام گرفت. سپس برای صحت انجام PCR، با انجام الکتروفورز برای محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، ژل آگارز زیر نور UV مشاهده شد. مارکر مورد استفاده برای تایید باندهای مورد نظر، مارکر VIII شرکت فرمنتاز می باشد (۱۱۱۴-۱۹ جفت باز) (شکل های ۳-۳ و ۳-۴).



شکل ۳-۳: الکتروفورز محصول PCR برای ERα.

الکتروفورز محصول PCR برای موتاسیون های rs2234693 (C/T) و rs9340799 (A/G) از گیرنده ERα (شکل ۳-۳): ۱، ۲ و ۳؛ باند 346bp محصول PCR - ۴؛ کنترل منفی - ۵؛ مارکر وزن مولکولی VIII.



شکل ۳-۴: الکتروفورز محصول PCR برای ER β .

(۱) الکتروفورز محصول PCR برای موتاسیون **rs1256030 (C/T)** : ۱، ۲ و ۳؛ باند 251bp محصول PCR - ۴؛ کنترل منفی - ۵؛ مارکر وزن مولکولی VIII.

(۲) الکتروفورز محصول PCR برای موتاسیون **rs4986938 (G/A)** : ۱؛ کنترل منفی - ۲؛ مارکر وزن مولکولی VIII - ۳، ۴ و ۵؛ باند 442bp محصول PCR.

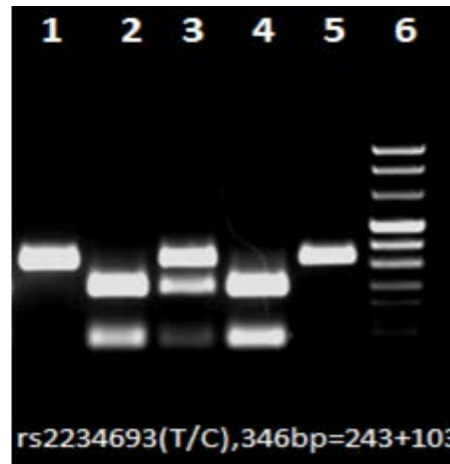
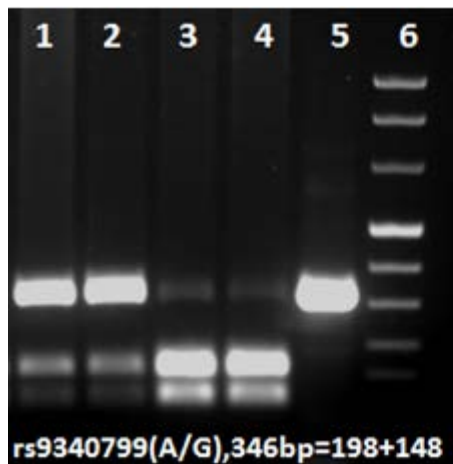
(۳) الکتروفورز محصول PCR برای موتاسیون **rs1256049 (G/A)** : ۱، ۲ و ۴؛ باند 321bp محصول PCR - ۴؛ مارکر وزن مولکولی VIII - ۵؛ کنترل منفی.

۳-۴- نتایج RFLP

پس از تایید صحت انجام PCR ، برای بررسی ژنوتیپ هر فرد و هر پلی مورفیسم، RFLP بر روی محصول PCR انجام شد. به منظور RFLP از آنزیم های محدودالایر^۱ و بافر مناسب آن و میزان مناسبی از محصول PCR استفاده می شود (جدول ۳-۲). برای بررسی نتیجه RFLP ، از الکتروفورز بر روی ژل آگارز استفاده شد (تصاویر ۳-۵ تا ۳-۶).

1 - Restriction Enzyme (RE)

۳-۴-۱- پلی مورفیسم های ژن گیرنده استروژن آلفا



(۲)

(۱)

شکل ۳-۵: نتایج الکتروفورز پس از RFLP بر روی محصولات PCR پلی مورفیسم گیرنده استروژن آلفا بر روی ژل آگارز ۲٪:

(۱) الکتروفورز پس از RFLP بر روی محصولات PCR پلی مورفیسم گیرنده استروژن آلفا موتاسیون rs2234693 (C/T) با استفاده از آنزیم محدودالایر PvuII: ۱؛ هموزیگوت نرمال - ۲ و ۴؛ هموزیگوت بیمار - ۳؛ هتروزیگوت - ۵؛ قطعه تکثیر شده ۳۴۶ جفت باز به عنوان کنترل - ۶؛ مارکر وزن مولکولی VIII.

(۲) الکتروفورز پس از RFLP بر روی محصولات PCR پلی مورفیسم گیرنده استروژن آلفا موتاسیون rs9340799 (A/G) با استفاده از آنزیم محدودالایر XbaI: ۱ و ۲؛ هتروزیگوت - ۳ و ۴؛ هموزیگوت نرمال - ۵؛ قطعه تکثیر شده ۳۴۶ جفت باز به عنوان کنترل - ۶؛ مارکر وزن مولکولی VIII.

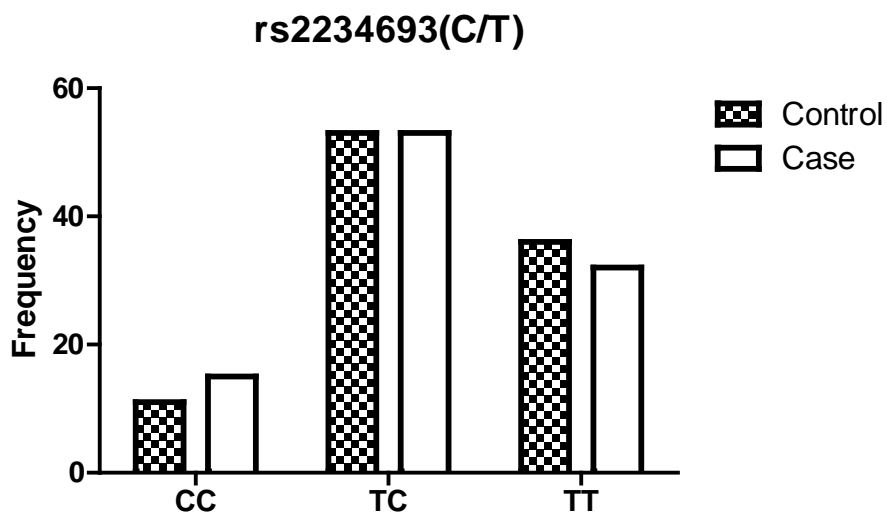
۳-۴-۱-۱- موتاسیون rs2234693 (C/T) در گیرنده استروژن آلفا

این موتاسیون در اینترون یک ژن گیرنده استروژن آلفا واقع شده است. فراوانی آلل های T و C در ۲۴۷ بیمار و ۱۰۵ نفر جمعیت کنترل محاسبه و مقایسه شد. در رابطه با این موتاسیون، در گروه کنترل احتمال وجود آلل C، ۳۷ درصد و احتمال وجود آلل T، ۶۲ درصد می باشد. برای گروه بیمار احتمال وجود آلل های C و T به ترتیب ۴۱٪ و ۵۸٪ می باشد. اختلاف معنی داری بین گروه بیمار و کنترل در آلل های C و T مشاهده نشد (جدول ۳-۴ و نمودار ۳-۱).

جدول ۳-۴: مقایسه فرکانس ژنوتایپی موتاسیون rs2234693 (C/T) در گیرنده استروژن آلفا

Genotype rs2234693 (C/T), ER α	Control N=105 F	(%)	Patients N=247 F	(%)
CC	۱۰	۹/۵	۴۳	۱۷/۴
TC	۵۹	۵۶/۵	۱۲۹	۵۲/۲
TT	۳۶	۳۴/۳	۷۵	۳۰/۴

N=number F=Frequency



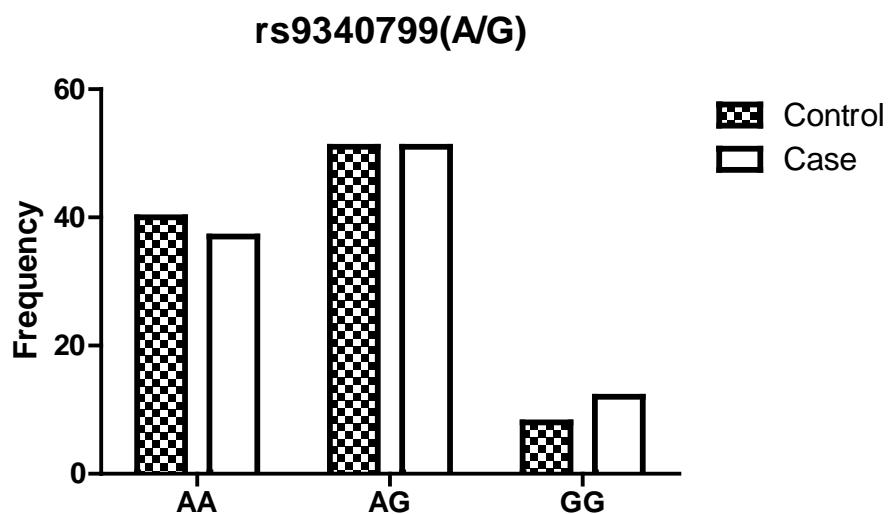
نمودار ۳-۱: مقایسه فرکانس ژنوتایپی موتاسیون rs2234693 (C/T) در گیرنده استروژن آلفا

۳-۴-۱-۲- موتاسیون rs9340799 (A/G) در گیرنده استروژن آلفا

این موتاسیون نیز در اینترون یک ژن گیرنده استروژن آلفا و نزدیک به موتاسیون rs9340799 (A/G) قرار دارد. فراوانی آلل های A و G در ۲۴۷ بیمار و ۱۰۵ جمعیت کنترل محاسبه و مقایسه شد. در رابطه با این موتاسیون، در بررسی نرمال، ۶۶٪ احتمال وجود آلل A و ۳۳٪ احتمال وجود آلل G می باشد، در حالیکه در گروه بیمار به ترتیب ۶۲٪ و ۳۷ درصد می باشد. همینطور فرکانس ژنوتایپ های AA، AG و GG حاصله در این دو جمعیت بررسی شد. اختلاف معنی داری بین گروه بیمار و کنترل در آلل های A و G مشاهده نشد (جدول ۳-۵ و نمودار ۳-۲).

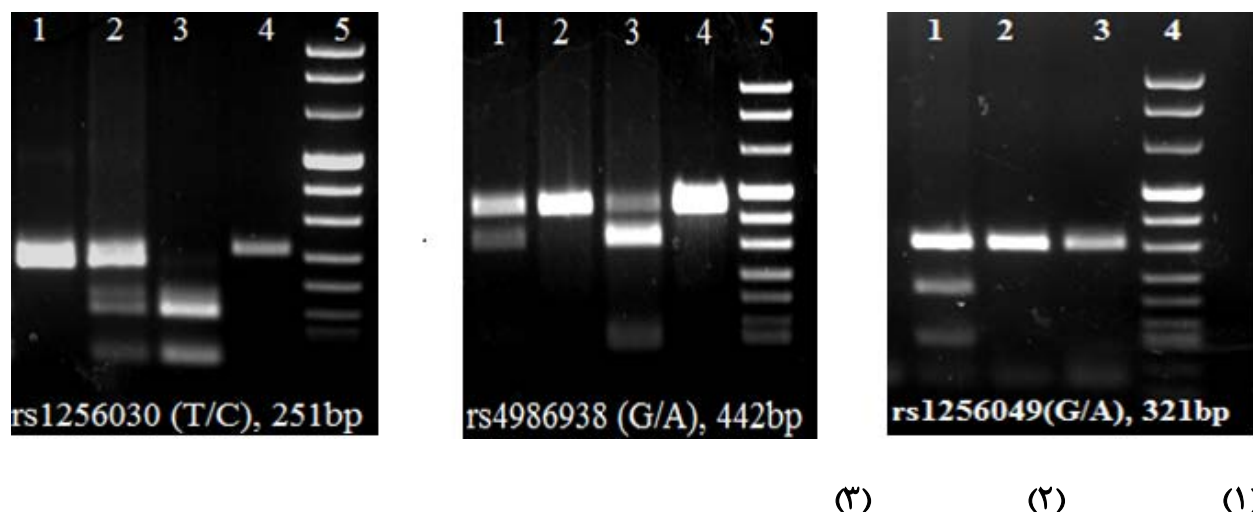
جدول ۳-۵: مقایسه فرکانس و ژنوتایپی موتاسیون rs9340799 (A/G) در گیرنده استروژن آلفا

Genotype rs9340799 (A/G), ER α	Control N=105 F	(%)	Patients N=247 F	(%)
AA	۳۹	۳۷/۱	۹۲	۳۶/۸
AG	۶۰	۵۷/۱	۱۲۴	۴۹/۶
GG	۶	۵/۷	۳۴	۱۳/۶



نمودار ۳-۲: مقایسه فرکانس و ژنوتایپی موتاسیون rs9340799 (A/G) در گیرنده استروژن آلفا

۳-۴-۲- پلی مورفیسم های ژن گیرنده استروژن بتا



شکل ۳-۶: نتایج الکتروفورز پس از RFLP بر روی محصولات PCR پلی مورفیسم گیرنده استروژن بتا بر روی ژل آگارز ۲٪:

(۱) الکتروفورز پس از RFLP بر روی محصولات PCR پلی مورفیسم گیرنده استروژن بتا موتاسیون rs1256049 (G/A) با استفاده از آنزیم محدودالایر **RsaI**: ۱؛ هتروزایگوت - ۲؛ هموزایگوت نرمال - ۳؛ قطعه تکثیر شده ۳۲۱ جفت باز به عنوان کنترل - ۴؛ مارکر وزن مولکولی VIII.

(۲) الکتروفورز پس از RFLP بر روی محصولات PCR پلی مورفیسم گیرنده استروژن بتا موتاسیون rs4986938 (G/A) با استفاده از آنزیم محدودالایر **AluI**: ۱؛ هتروزایگوت - ۲؛ هموزایگوت نرمال - ۳؛ هموزایگوت بیمار - ۴؛ قطعه تکثیر شده ۴۴۲ جفت باز به عنوان کنترل - ۵؛ مارکر وزن مولکولی VIII.

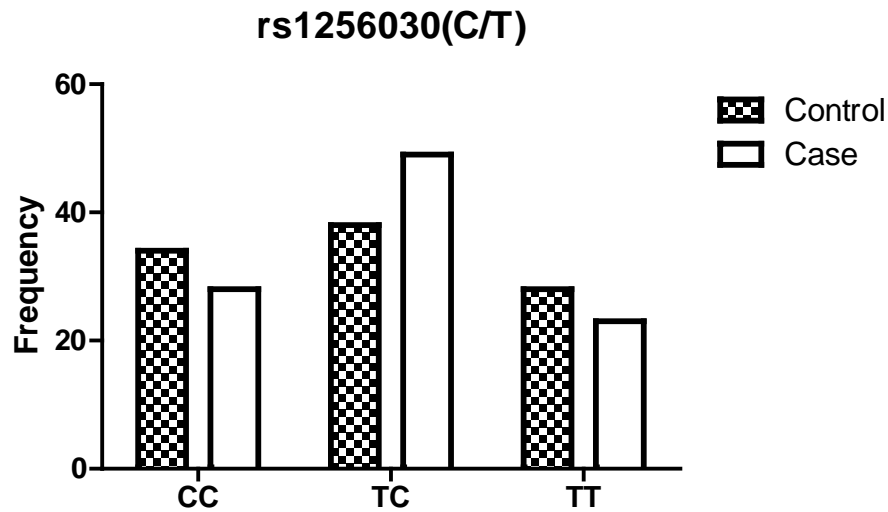
(۳) الکتروفورز پس از RFLP بر روی محصولات PCR پلی مورفیسم گیرنده استروژن بتا موتاسیون rs1256030 (C/T) با استفاده از آنزیم محدودالایر **AluI**: ۱؛ هموزایگوت نرمال - ۲؛ هتروزایگوت - ۳؛ هموزایگوت بیمار - ۴؛ قطعه تکثیر شده ۲۵۱ جفت باز به عنوان کنترل - ۵؛ مارکر وزن مولکولی VIII.

۳-۴-۲-۱- موتاسیون (C/T) rs1256030 در گیرنده استروژن بتا

فراوانی آلل های C و T در ۲۴۹ بیمار و ۱۰۲ نفر جمعیت کنترل محاسبه و مقایسه شد. در رابطه با این موتاسیون، در بررسی نرمال، ۵۲٪ احتمال وجود آلل C و ۴۷٪ احتمال وجود آلل T می باشد، در حالیکه در گروه بیمار به ترتیب ۵۲٪ و ۴۷٪ درصد می باشد. همینطور فرکانس ژنوتایپ های CC، CT و TT حاصله در این دو جمعیت بررسی شد. اختلاف معنی داری بین گروه بیمار و کنترل در آلل های C و T مشاهده نشد (جدول ۳-۶ و نمودار ۳-۳).

جدول ۳-۶: مقایسه فرکانس ژنوتایپی موتاسیون (C/T) rs1256030 در گیرنده استروژن بتا

Genotype rs1256030 (C/T), ERβ	Control N=102 F	(%)	Patients N=249 F	(%)
CC	۲۸	۳۷/۵	۵۶	۲۲/۵
TC	۳۸	۳۷/۳	۱۱۸	۴۷/۵
TT	۳۶	۳۵/۳	۷۵	۳۰/۱



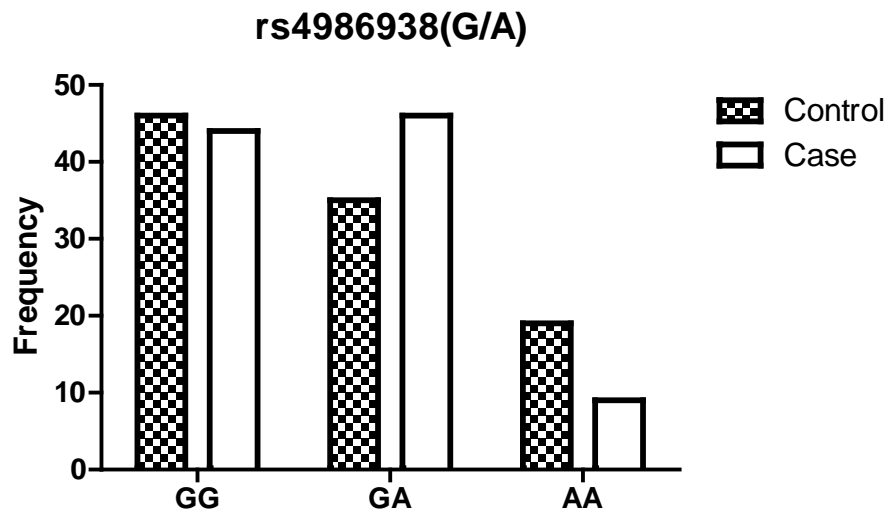
نمودار ۳-۳: مقایسه فرکانس ژنوتایپی موتاسیون rs1256030 (C/T) در گیرنده استروژن بتا

۳-۴-۲- موتاسیون rs4986938 (G/A) در گیرنده استروژن بتا

فراوانی آلل های G و A در ۲۴۹ بیمار و ۱۰۲ جمعیت کنترل محاسبه و مقایسه شد. در رابطه با این موتاسیون، در بررسی نرمال، ۶۳٪ احتمال وجود آلل G و ۳۶٪ احتمال وجود آلل A می باشد، در حالیکه در گروه بیمار به ترتیب ۶۶٪ و ۳۲٪ درصد می باشد. همینطور فرکانس ژنوتایپ های GA, GG و GG حاصله در این دو جمعیت بررسی شد. اختلاف معنی داری بین گروه بیمار و کنترل در آلل های G و A مشاهده نشد (جدول ۳-۷ و نمودار ۳-۴).

جدول ۳-۷: مقایسه فرکانس ژنوتایپی موتاسیون rs4986938 (G/A) در گیرنده استروژن بتا

Allele/Genotype rs4986938 (G/A), ER β	Control N=102 F	(%)	Patients N=249 F	(%)
GG	۴۸	۴۷/۱	۱۱۴	۴۸/۳
AG	۳۳	۳۲/۴	۱۱۱	۴۴/۶
AA	۲۱	۲۰/۶	۲۴	۹/۶



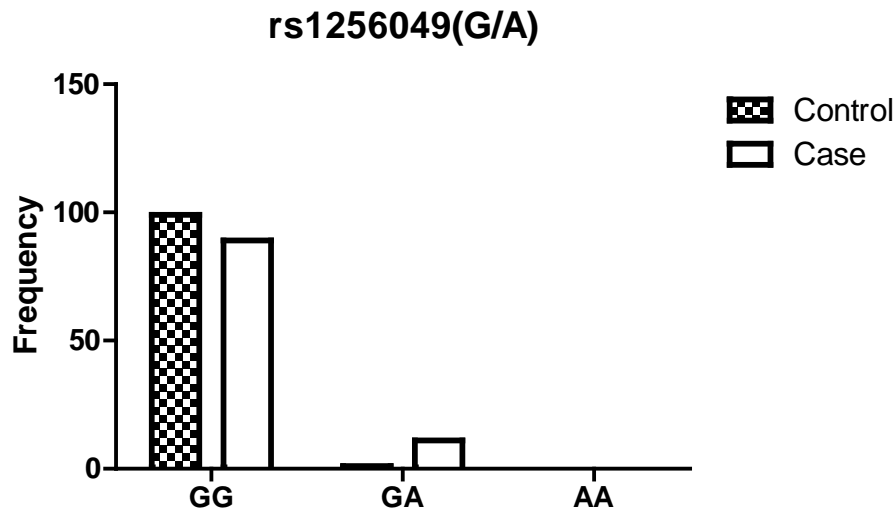
نمودار ۳-۴: مقایسه فرکانس ژنوتایپی موتاسیون rs4986938 (G/A) در گیرنده استروژن بتا

۳-۴-۲-۳- موتاسیون rs1256049 (G/A) در گیرنده استروژن بتا

فراوانی آلل های G و A در ۲۴۹ بیمار و ۱۰۲ جمعیت کنترل محاسبه و مقایسه شد. در رابطه با این موتاسیون، در بررسی نرمال، ۹۹٪ احتمال وجود آلل G و ۱٪ احتمال وجود آلل A می باشد، در حالیکه در گروه بیمار به ترتیب ۹۴٪ و ۵ درصد می باشد. همینطور فرکانس ژنوتایپ های GG، GA و GG حاصله در این دو جمعیت بررسی شد. اختلاف بین گروه بیمار و کنترل در آلل های G و A معنی دار بود (جدول ۳-۸ نمودار ۳-۴).

جدول ۳-۸: مقایسه فرکانس ژنوتایپی موتاسیون rs1256049 (G/A) در گیرنده استروژن بتا

Genotype rs1256049 (G/A), ERβ	Control N=102 F	(%)	Patients N=249 F	(%)
GG	۹۹	۹۷/۱	۲۲۸	۹۱/۶
AG	۳	۲/۹	۲۱	۸/۴
AA	۰	۰	۰	۰



نمودار ۳-۴: مقایسه فرکانس ژنوتایپی موتاسیون rs1256049 (G/A) در گیرنده استروژن بتا

۳-۵- نتایج بررسی های آماری

با توجه به نتایج مشاهده شده الکتروفورز محصول RFLP بر روی ژل آگارز ۲٪ ژنوتیپ هر فرد برای هر پلی مورفیسم مشخص شد.

پس از تعیین فراوانی ژنوتیپ ها برای هر دو گروه بیمار و کنترل، بررسی های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS (ver:13.00) بر روی اطلاعات بدست آمده انجام شد.

در ابتدا آزمون χ^2 برای سه حالت نرمال، هتروزیگوت و هموزیگوت در دو گروه شاهد و نمونه انجام گرفت (جدول ۳-۹). این آزمون ها تنها برای یک پلی مورفیسم گیرنده استروژن بتا معنی دار بود ($p\text{-value} < 0.05$).

پس از بدست آوردن فراوانی آلل ها برای این ۵ پلی مورفیسم در دو گروه نمونه و کنترل با استفاده از فراوانی سه حالت نرمال، هتروزیگوت و هموزیگوت این پلی مورفیسم ها در این دو گروه آزمون χ^2 برای فراوانی آلل ها نیز انجام گرفت. نتیجه آزمون برای χ^2 برای موتاسیون rs1256049 اختلاف معنی دار بین دو گروه نرمال و بیمار بود ($p\text{-value} < 0.055$).

جدول ۳-۹: بررسی فراوانی پلی مورفیسم های گیرنده های استروژن آلفا و بتا بر اساس آزمون χ^2 برای سه حالت نرمال، هتروزیگوت و هموزیگوت در دو گروه شاهد و نمونه n(%).

P-value	شاهد			نمونه			پلی مورفیسم
	هموزیگوت n(%)	هتروزیگوت n(%)	نرمال n(%)	هموزیگوت n(%)	هتروزیگوت n(%)	نرمال n(%)	
۰/۱۵۷	۳۴/۳	۵۶/۵	۹/۵	۳۰/۴	۵۲/۲	۱۷/۴	rs2234693 (C/T)
۰/۳۸۲	۵/۷	۵۷/۱	۳۷/۱	۱۳/۶	۴۹/۶	۳۶/۸	rs9340799 (A/G)
۰/۲۳۳	۳۵/۳	۳۷/۳	۳۷/۵	۳۰/۱	۴۷/۵	۲۲/۵	rs1256030 (C/T)
۰/۰۰۷	۲۰/۶	۳۲/۴	۴۷/۱	۹/۶	۴۴/۶	۴۸/۳	rs4986938 (G/A)
۰/۰۵۷	۰	۲/۹	۹۷/۱	۰	۸/۴	۹۱/۶	rs1256049 (G/A)

فصل چهارم

بحث و پیشنهادات

پلی مورفیسم به معنی واریان طبیعی در یک لکوس خاص از ژنوم می باشد. پلی مورفیسم ژنتیکی به دلیل موتاسیون در یک لکوس به دنبال نیروهای تکاملی از قبیل، انتخاب طبیعی یا رانش ژن ایجاد شده و به این ترتیب نسل های بعدی آن جمعیت، حاوی این پلی مورفیسم ها در ژنوم خود می باشند.

اگر توالی ناحیه دقیقا یکسانی از DNA واقع در محل خاصی روی یک کروموزوم را در افراد مختلف گوشه و کنار جهان تعیین کنیم و با هم مقایسه کنیم، تشابه بسیار زیادی بین آن ها مشاهده می شود. در واقع، هر قطعه از DNA انسان به طول تقریبا ۱۰۰۰ جفت باز، به طور متوسط حاوی فقط یک جفت باز متفاوت بین دو فرد در آن جمعیت است. وقتی آلل ها به حدی فراوان باشند که در بیش از ۱٪ کروموزوم ها در جمعیت عمومی یافت شوند، آنچه را که پلی مورفیسم نام دارد تشکیل می دهند. در مقابل آلل هایی با فراوانی کمتر از ۱٪ را، طبق قرارداد، انواع نادر می نامند. برخی آلل ها، که نمایانگر تغییری در توالی DNA واقع بین ژن ها یا در داخل اینترون ها می باشند، معمولا تاثیری بر عملکرد ژنی ندارند، و با تجزیه و تحلیل مستقیم DNA قابل شناسایی اند. تغییرات دیگر توالی، در توالی رمزدار خود ژن ها، قرار دارند و ممکن است به ایجاد انواع مختلفی از پروتئین منجر می گردد، که به نوبه خود امکان دارد موجب فنوتیپ های کاملا متمایز شوند (۷۴). بسیاری از موتاسیون ها بی خطر و بسیاری دیگر نیز طی چند نسل برای همیشه حذف می شوند (۷۵).

امروزه مشخص شده است که تنها ۵٪ از ژنوم انسانی جزو نواحی کد شونده می باشند، بنابر این اکثر پلی مورفیسم های موجود در بدن، در نواحی غیر کد شونده واقع شده اند. اگرچه تمام چند شکلی ها نهایتا در نتیجه، تفاوت های توالی DNA می باشند، برخی جایگاه های ژنی، با بررسی تفاوت در پروتئین های رمز گردانی شده توسط آلل ها مطالعه شده اند، نه با بررسی تفاوت های توالی DNA خود آلل ها (۷۴).

کاربرد پلی مورفیسم در ژنتیک پزشکی شامل موارد زیر می باشد:

۱- استفاده از مارکر های ژنتیکی جهت تعیین محل یک ژن خاص بر روی کروموزوم با استفاده از تجزیه و تحلیل پیوستگی ژنتیکی.

۲- تشخیص پیش از تولد بیماری های ژنتیکی.

۳- شناسایی ناقلان هتروزیگوت بیماری های ژنتیکی.

۴- ارزیابی افراد پر خطر و کم خطر از نظر استعداد ابتلا به اختلالات شایع بالغین مانند: بیماری عروق کرونر قلب، سرطان، دیابت و به طور کلی بیماری های مولتی فاکتوریال مثل سندرم سقط مکرر (۷۴).

امروزه مشخص شده است که ژن های کد کننده گیرنده های استروژنی، دارای واریان های طبیعی مختلفی هستند و احتمال این که فراوانی یک آلل یا ژن خاص کد کننده این گیرنده ها با افزایش استعداد ابتلا به این بیماری همراه باشد، قویا مطرح شده است.

استروژن در رشد جنینی، بروز صفات ثانویه جنسی، سیکل باروری و نگهداری بارداری نقش مهمی ایفا می کند. علاوه بر این استروژن رشد و تمایز سلول های اندومتر را نیز تنظیم می کند (۳۳). استروژن همچنین در فرایندهای آسیب شناسی بیماری های وابسته به هورمون مثل سرطان تخمدان، سینه، روده و استخوان، اندومتريوز و بیماری های تولید مثلی نیز تأثیر دارد (۳۴). به نظر می رسد تفاوت های فردی در میزان بیان گیرنده های استروژنی یا حداقل بخشی از آن، مربوط به پلی مورفیسم آلی در درون نواحی تنظیمی در ژن گیرنده های استروژنی می باشد.

بسیاری از مطالعات، ارتباط بین پلی مورفیسم های ژن گیرنده های استروژنی، بیان ژن، استعداد ابتلا، شدت کلینیکی بیماری و همین طور پاسخ به درمان بیماری های را بررسی می کنند (۶۸، ۷۶-۷۸).

همان طور که در فصل اول بحث شد، استروژن در انسان فرآیندهای فیزیولوژیک مختلفی را تحت تاثیر قرار می دهد، که از جمله آن ها می توان به فرآیندهای تولیدمثلی، سلامتی قلب و عروق، تمامیت و سلامت استخوان ها و همچنین رفتار و خلق و خو در فرد اشاره نمود. نکته جالب آن است که استروژن علاوه بر اینکه برای سلامتی انسان ضروری و حیاتی می باشد، این هورمون در ایجاد و پیشرفت بیماری های مختلف نیز دخیل است، از جمله؛ انواع مختلف سرطان ها (سینه، تخمدان، روده بزرگ، پروستات و اندومتر رحم)، پوکی استخوان، بیماری های سیستم عصبی، بیماری های قلبی- عروقی، مقاومت به انسولین، لوپوس اریتماتوز، نفریت لوپوس، اندومتريوز، چاقی و حتی رد عضو پیوندی در بدن میزبان ^۱ (۷۹-۸۸).

حاملگی کاملاً وابسته به تغییرات اندوکرینولوژیک زمان بندی شده سیکل قاعدگی است. آن دسته از اختلالات هورمونی که در نهایت امکان تداوم حاملگی را مختل می کنند، ممکن است آثار خود را در طی

^۱ - graft-versus-host disease (GVHD)

مرحله ای از سیکل که در آن لقاح اتفاق می افتد و یا حتی زودتر اعمال کنند. در این میان نقش استروژن ها در تنظیم فعالیت های جفت و رشد جنین حائز اهمیت است. به طور خلاصه این هورمون دارای نقش اساسی در رشد و تکامل رویان و جنین، صفات ثانویه جنسی، سیکل تولیدمثلی، باروری و تقویت حاملگی است. خارج کردن جسم زرد در مراحل اولیه حاملگی، باعث کاهش سطح سرمی استروژن و پروژسترون می شود که این امر منجر به سقط می گردد (۳۸). هورمون های استروئیدی در تنظیم تغییرات مویرگ های خونی اندومتریوم، نفوذ پذیری آن ها و جریان خون نقش مهمی دارند (۳۹-۴۱). استروژن همچنین در فرایندهای آسیب شناسی بیماری های وابسته به هورمون مثل سرطان تخمدان، سینه، روده و استخوان نیز تأثیر دارد (۳۴). این هورمون تأثیرات فیزیولوژیک خود را از طریق گیرنده های مخصوص به خود اعمال می کند. همانطور که بیان شد، دو گروه اصلی از گیرنده های استروژنی $ER\alpha$ و $ER\beta$ هستند (۵۱، ۵۲). این دو گیرنده با الگوی بیان متفاوت در ارگان ها، تأثیرات فیزیولوژیک مختلفی را ایفا می کنند که تا کنون این تأثیرات به طور کامل مشخص نشده و در مطالعات مختلف به آن اشاره شده است (۸۹). علی رغم اینکه بیشتر پلی مورفیسم های حادث شده در ژن این دو گیرنده، در نواحی اینترونی قرار دارند، اما مطالعات نشان می دهند، این پلی مورفیسم ها می توانند در الگوی بیان ژن، ایجاد بیماری های متفاوت و حتی پاسخ به درمان دارای نقش باشند، که در ادامه به تفصیل مورد بحث قرار می گیرند.

بررسی پلی مورفیسم ژنی گیرنده های استروژنی به چند منظور انجام می شود:

برای افزایش فهم و اطلاعات در مورد اتیولوژی و پاتولوژی بیماری های انسانی.

برای تعیین مارکرهای استعداد ابتلا به بیماری، شدت بیماری و انواع کلینیکی.

برای تعیین اهدافی برای درمان های مداخله ای.

جهت تعیین استراتژی های جدید برای جلوگیری از بیماری.

افزایش و یا کاهش بیان^۱ و تولید هورمون ها و رسپتورهای آن ها، عاملی اثر گذار در تمام بیماری های انسانی می باشد. اگرچه، این پاسخ بسته به شرایط مختلف به طور معنی داری در افراد مختلف متفاوت است. مطالعات بیان *in vitro* رسپتور هورمون ها جهت تعیین پایه های ژنتیکی تفاوت فردی در پاسخ به

¹ - Up regulated and/or down regulated expression

دارو ها و شرایط فیزیولوژیک متفاوت و به وسیله آزمایش ارتباط بین آلل های چند شکل افراد و یا هاپلوتایپ های ژن های هورمون ها و گیرنده های آن ها و بیان در *in vitro* می باشد. روش های اصلی امروزی مورد استفاده، شامل اندازه گیری مقدار بیان رسپتور هورمون ها در *in vitro* در اثر تحریک سلول های کشت داده شده با میتوژن ها، و جدا کردن پروموتور ژنی آلل های افراد با روش کلونینگ و انتقال به یک *reporter gene* در ناقل بیانی صورت می گیرد و به سلولی مناسب ترانس فکت می شود و اندازه بیان پروتئین گزارشگر گرفته می شود. اکثر مطالعات تا به امروز روش اول را دنبال کرده اند.

آنالیز ژنتیکی هورمون ها و گیرنده های آن در بیماری انسانی به طور سنتی بر روی مطالعات ارتباط *case-control* است، که در آن فرکانس آلل های مارکر در گروه های بیمار و گروه سالم مقایسه می شود و تفاوت های این دو گروه، موضوعی برای آنالیز آماری می شود.

ارتباط به عنوان *relative risk* و یا *Odds ratio* بیان می شود به این صورت که یک فرد حامل کننده یک آلل و یا مارکر خاص در مقایسه با افرادی که این آلل را حمل نمی کنند، استعداد ابتلا به آن بیماری در این فرد بیشتر خواهد بود. این مطالعات موفقیت نسبی در تعیین ژن های ایجاد کننده بیماری را داشته اند.

دشواری تعیین یک گروه کنترل متناسب، نوعی محدودیت ایجاد می کند. افزایش این احتمال که یک ارتباط مثبت بالقوه از نظر بیولوژیکی به دلیل مخلوط شدن جمعیت های متفاوت باشد وجود دارد. به علاوه، حتی وقتی که گروه کنترل و گروه بیمار نیز متناسب هستند، گاهی دیده می شود که در بعضی مطالعات ساینز مطالعه کوچک است که موجب فقدان قدرت آماری در نتایج می شود.

مطالعه ای که در سال ۲۰۰۸ توسط آلسیو^۱ و همکارانش بر روی زنان نژاد بومی برزیلی و زنان نژاد قفقازی مقیم برزیل صورت گرفت، بیان می نمود پلی مورفیسم ژن گیرنده استروژن آلفا در دو موقعیت، -351A/G و 397C/T، با سندرم سقط مکرر در ارتباط نمی باشد. این تحقیق همچنین بیان می نمود که، در قومیت های متفاوت تاثیرات این پلی مورفیسم ها می تواند متفاوت باشد (۷۰٪). در مطالعه ی

1 - Aléssio

دیگری که در سال ۲۰۱۰ توسط هانا^۱ و همکارانش بر روی زنان کانادایی صورت گرفت، نتوانستند چنین ارتباطی را به اثبات برساند، اگرچه این گروه معتقد بودند، با افزایش جمعیت مورد مطالعه، امکان تغییر نتایج وجود دارد (۷۱).

در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۰ توسط پیندا^۲ و همکارانش بر روی زنان اسپانیایی صورت گرفت بیان می نمود، دو پلی مورفیسم فوق با سندرم سقط مکرر دارای ارتباط معنی داری می باشد (۶۸).

در مطالعه ما، بررسی فراوانی آللی و ژنوتایپی در جمعیت زنان ایرانی دارای مشکل سقط مکرر (حداقل دارای سه سقط مکرر) به عنوان گروه بیمار و زنان نرمال (دارای دو بارداری موفق) به عنوان گروه کنترل، در موقعیت های 351A/G و 397C/T- ژن گیرنده استروژن آلفا تفاوت معنی داری نشان نداد. در این رابطه تحقیقات زیادی صورت نگرفته و در کشور عزیزمان ایران، تحقیق حاضر اولین بررسی در این رابطه می باشد. نتایج ما تایید کننده تحقیقات صورت گرفته در کشورهای برزیل و کانادا می باشد. دو پلی مورفیسم حاضر دارای LD منفی می باشند ($r = -0.86$).

استروژن در تکامل فولیکول و تقویت حاملگی، نقش مهم و اساسی ایفا می کند. موش های مونث نول^۳ در ژن ESR1، نابارور بوده و علاوه بر عدم تشکیل کورپوس لوتئوم^۴، دارای تغییراتی در سطح ترشح گنادوتروپین ها بودند. در مقابل، موش های مونث نول در ژن ESR2 به نسبت موش های نرمال، از شانس باروری کمتری برخوردار بودند. در این موش ها، میزان اووسیت ها کاهش می یابد که علت آن را می توان کاهش پاسخ تخمدان ها نسبت به گنادوتروپین ها در نظر گرفت (۹۰).

تعداد ۲۲۰۰ پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی تا کنون بر روی ژن گیرنده استروژن آلفا شناسایی شده است (www.snpper.chip.org)، و مطالعات نشان می دهد که اکثر آن ها با کاهش یا افزایش ریسک بیماری ها و پاسخ های درمانی متفاوت در ارتباط می باشند. دو SNP که در مقالات بیشتر به آن ها توجه شده است و ما در مطالعات خود به بررسی آن ها پرداخته ایم عبارتند از: rs2234693 (C/T) و rs9340799 (A/G)، که در اینترون یک واقع شده اند و به ترتیب در موقعیت های 397- و 351-

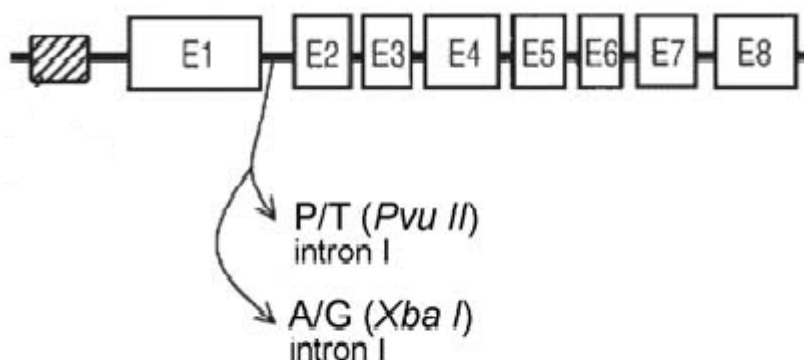
¹ - Hanna

² - Pineda

³ - Null

⁴ - corpus luteum

نسبت به اگزون دو قرار دارند (تصویر ۴-۱). این دو پلی مورفیسم را با نام آنزیم هایی که در PCR-RFLP برای این SNP ها دارای سایت برش می باشند نیز می شناسند؛ PvuII و XbaI (۹۱، ۹۲).



تصویر ۴-۱: جایگاه پلی مورفیسم های rs2234693 (C/T) و rs9340799 (A/G). نواحی E، اگزون ها را نمایش می دهند (۹۳).

بررسی های مختلف این دو پلی مورفیسم در رابطه با بیماری ها و شرایط فیزیولوژیک مشابه در جمعیت های گوناگون دارای نتایج متفاوت می باشد. این دو SNP در فاصله ۵۰ جفت باز از یکدیگر در اینترون ۱ قرار دارند، و وقوع آن ها در ارتباط با یکدیگر است (LD)^۱. نتایج بررسی های ما نیز نشان می دهد این دو SNP دارای LD منفی هستند، به عبارت دیگر وقوع یکی و عدم وقوع دیگری. اولین اینترون در یک ژن همانند پروموتور ژن معمولاً دارای توالی های تنظیمی بیشتری در مقایسه با سایر اینترون ها می باشد. به طور خلاصه، برخی از اینترون ها دارای توالی های تنظیمی از جمله افزاینده ها می باشند، این بدان معنی

¹ - linkage disequilibrium

است که آن‌ها شامل مناطقی برای اتصال عواملی می‌باشند که رونویسی از ژن را تنظیم کرده، و در نهایت می‌توانند بیان پروتئین مورد نظر را دستخوش تغییرات نمایند (۹۴-۹۶). مکانیسم‌هایی عملکردی که در رابطه با این دو SNP پیشنهاد می‌شود شامل تغییر در الگوی بیان ژن $ER\alpha$ به علت تغییر در اتصال فاکتورهای رونویسی و همچنین تحت تاثیر قرار دادن برش‌های متفاوت mRNA^۱ ژن مذکور قبل از ترجمه پروتئین می‌باشد. در مطالعه‌ای بیان شده است که آلل C در موقعیت 397-، می‌تواند منجر به افزایش بیان ژن ESR1 شود (۹۷).

مطالعات بسیاری بیانگر این واقعیت می‌باشند که این دو پلی مورفیسم ژن گیرنده استروژنی آلفا (ESR1) می‌توانند بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیک در انسان، به خصوص زنان، را تحت تاثیر قرار دهد. همچنین از آن‌ها می‌توان به عنوان فاکتوری در اتیوپاتولوژی بیماری‌های گوناگون نام برد، که از جمله آن‌ها می‌توان به ناباروری و سقط مکرر اشاره نمود.

در بررسی‌هایی که در رابطه با قومیت و نژادهای مختلف صورت گرفته است، الگوهای هاپلوتایپ و فرکانس آللی به طور معنی‌داری متفاوت بوده است. الگوهای هاپلوتایپ مطالعه شده به انضمام الگوی هاپلوتیپی جمعیت زنان ایرانی مورد مطالعه ما به طور خلاصه در جدول ۱-۴ نشان داده شده است.

در جمعیت قفقازهای بررسی شده در ایتالیا، انگلستان و کانادا، و همچنین جمعیت زنان ایرانی مطالعه شده در این تحقیق، هاپلوتایپ pX و Px بسیار کم است. این درحالی است که همچنین الگویی در بررسی‌های صورت گرفته در ژاپن و کره (نژاد آسیایی) گزارش نشده است و در این جمعیت هاپلوتایپ Px و PX از الگوی متفاوتی نسبت به مطالعه ما برخوردار بودند. در جمعیت نژاد بومی آمریکایی نیز الگوی کاملاً متفاوتی نسبت به نژاد قفقاز و آسیایی مشاهده می‌شود. در بیشتر مطالعات صورت گرفته هاپلوتایپ pX مشاهده نشده و هاپلوتایپ Px با مقادیر پایین گزارش شده است. تنها توجیهی که می‌توان در رابطه با این موضوع بیان کرد، این است که احتمالاً برخی از نوترکیبی و موتاسیون‌هایی متعدد که در بین این دو ناحیه پلی مورفیک اتفاق می‌افتد، الگوی LD آن‌ها را برهم می‌زند.

¹ - alternative splicing

جدول ۴-۱ - مقایسه فراوانی هاپلوتیپ پلی مورفیسم های موقعیت های 397C/T و 351A/G- واقع شده در ژن گیرنده استروژن آلفا در کشورهای متفاوت

Ethnic group	Place of study	No. of subject	PvuII and XbaI haplotype(%)				Study
			px	PX	Px	pX	
Asians	Japan	238	54.5	18.7	26.5	0.3	Kobayashi Et al. (98)
Asians	Japan	2238	59.4	18.3	22.3	0	Yamada et al. (99)
Asians	Korea	598	57.7	18.5	22.3	2.3	Han et al. (100)
Caucasians	Denmark	454	53.0	33.7	13.3	0	Bagger et al. (101)
Caucasians	Netherlands	1100	53.0	36.1	10.9	0	Van Meurs et al. (102)
Caucasians	United Kingdom	206	56.1	33.5	9.2	1.2	Albagha et al. (103)
Caucasians	Italy	610	52.1	40.9	5.7	1.3	Becherini et al. (104)
Caucasians	Canada	662	54.9	35.6	9.5	0	Patel et al. (105)
African American	United states	19	36.8	50.0	13.6	0	Van Meurs et al. (102)
Caucasians	Poland	64	47.4	17.3	24.4	10.9	Jakimiuk Et al. (93)
Asians	Iran	236	58.8	35.3	4.7	1.1	Mahdavi pour et al. [submitted]

px= TA

PX= CG

Px= CA

pX= TG

گمان می شود وجود هاپلوتایپ PX در تنظیم بافت هایی که از ابتدا یا در ادامه زندگی فرد، در معرض مقادیر بالای استروژن قرار دارند، حائز اهمیت می باشد. در مطالعه ای بیان می شود که پلی مورفیسم های ژن $ER\alpha$ ، به خصوص موقعیت 397C/T- می تواند سن یائسگی در زنان را تحت تاثیر قرار دهد. (۱۰۶). این گروه نشان دادند وجود آلل P سن یائسگی را کاهش میدهد، اگرچه دو مطالعه دیگر که در جمعیت ژاپنی و هلندی صورت گرفت، این نتایج را تایید نکرد (۱۰۷، ۱۰۸).

نتایج مطالعه ای که در رابطه با سن منس^۱ دختران، در جمعیت دختران سالم یونانی انجام گرفت، حاکی از آن است که، وجود دو پلی مورفیسم مذکور می توانند، سن وقوع این رویداد را دچار تغییر کنند. به طور خلاصه این بررسی نشان می دهد دخترانی که هاپلوتایپ PX را نشان می دادند، نسبتا سن منس بالاتری نسبت به باقی هاپلوتایپ ها دارند. اگرچه مکانیسم این رویداد در رابطه با سن منس هنوز به طور کامل شناخته شده نیست (۹۳). بدون در نظر گرفتن مکانیسم دقیق، اگر پلی مورفیسم های ژن $ER\alpha$ ، توانایی تغییر فعالیت بیولوژیکی استروژن را در سطح سلولی دارند، احتمال ایجاد تاثیر بر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز- تخمدان وجود دارد. و این تاثیرات می توانند عامل تعیین کننده ای بر شروع سن منس در دختران باشد.

در مطالعه ای که توسط سالم^۲ و همکارانش انجام شد، بیان می شود، ژنوتیپ PP در پلی مورفیسم موقعیت 397C/T- حساسیت کمتری نسبت به تحریکات استروژنی دارد، در مقابل ژنوتیپ شامل p از حساسیت بیشتری نسبت به تحریکات استروژنی برخوردار است (۱۰۹، ۱۱۰). این واقعیت حاکی از اهمیت ژنوتیپ گیرنده استروژنی می باشد و توجیهی بر نتایج مختلف هورمون درمانی در رابطه با برخی از بیماری ها از جمله بیماران قلبی- عروقی در افراد متفاوت می باشد (۱۱۱).

مطالعات گوناگونی در رابطه با پلی مورفیسم های ژن $ER\alpha$ و بیماری های قلبی- عروقی، در قومیت های مختلف و جنسیت زن و مرد انجام شده است. در اکثر این مطالعات به ارتباط دو پلی مورفیسم مذکور با ریسک و شدت بیماری های قلبی- عروقی اشاره شده است. در یکی از این مطالعات بیان می شود، استروژن درمانی یا HRT^۳ در زنان یائسه ای که از بیماری عروق کرونری رنج می برند در موقعیت T/C IVS1-401 دارای ژنوتیپ pp هستند، با افزایش سطح HDL کلسترول خون آن ها همراه بود (۱۱۲).

^۱ -menarch

^۲ - Salmén

^۳ -Hormone Replacement Therapy

مطالعات دیگری نیز وجود دارند که این ارتباط را با ژنوتیپ pp در موقعیت 397C/T- در زنان یائسه تایید می کنند (۱۱۳-۱۱۵). همچنین نورداستروم^۱ ثابت می کند وجود آلل p در این موقعیت پلی مرفیک افراد با افزایش ریسک اسکروز شدن در پیچه آئورت قلب ارتباط معنی داری دارد (۱۱۶). اگرچه در مطالعات دیگری نشان داده شده است که وجود آلل p و x در زنان با افزایش ریسک بیماری های میوکارد همراه است (۱۱۷). به علاوه در رابطه با پلی مورفیسم موقعیت 351 A/G- مطرح شده است که ژنوتیپ XX با افزایش ریسک بیماری های عروق کرونری در زنان یائسه که دارای سابقه هایپرکلسترومی فAMILI هستند، همراه است (۱۱۸). در مقابل تمام این مطالعات، بررسی هایی دیگر در زنان یائسه وجود دارند که نمایانگر نتایجی هستند که این ارتباطات را کم رنگ تر نشان می دهند (85, 119, 120).

در مطالعه ای که توسط لاولر^۲ و همکارانش صورت گرفت، به بررسی جمعیت زنان یائسه ۲۳ شهر مختلف در بریتانیا پرداختند، به نظر می رسید افرادی که دارای هاپلوتیپ px(TA) هستند، کمترین پاسخ را نسبت به درمان های استروژنی می دهند (117).

همچنین پلی مورفیسم موقعیت 397C/T- شانس ابتلا به سرطان سینه و سرطان آندومتر را افزایش می دهد و می توان نتیجه گیری نمود که این پلی مورفیسم با هر گونه بیماری که در آن استروژن دخیل است، در ارتباط می باشد. در بررسی های انجام شده به نظر می رسد، ژنوتیپ XX در موقعیت 351 A/G- می تواند شانس ابتلا به سرطان سینه و سرطان آندومتر را در افراد کاهش دهد (۱۲۱، ۱۲۲). این در حالی است که ژنوتیپ PP در موقعیت 397C/T- ارتباط معنی داری با کاهش ریسک ابتلا به سرطان آندومتر در افراد نشان نداده است (۱۱۷). تمامی این یافته ها و نتایج تا کنون نتوانسته اند تصویر واضحی در رابطه با علل و مکانیسم ها مشخص کنند، و هنوز مشخص نیست تفاوت ها در ارتباط با داده های استروژن ها، به علت تفاوت در سطح استروژن تولیدی، بیان متفاوت گیرنده های استروژنی، تفاوت زمانی در معرض استروژن قرار گرفتن بافت ها و یا ترکیبی از همه این عوامل می باشد.

می توان این گونه نتیجه گیری کرد، که قسمتی از نقش محافظتی ژنوتیپ XX در سرطان آندومتر می تواند به علت تاخیر منس در افراد دارای این هاپلوتایپ باشد (۱۲۳). در بسیاری از مطالعات بیان شده است که تاخیر در سن قاعدگی می تواند عامل مهمی در جلوگیری از ابتلا به سرطان سینه و سرطان آندومتر باشد، چرا که بافت های مذکور مدت زمان کمتری در معرض تولیدات استروژنی قرار داشته اند.

¹ - Nordström

² -Lawlor

بررسی هایی که در رابطه با تومورهای تخمدان انسان انجام گرفته است، نشان می دهند گیرنده های استروژنی تقریباً در دو- سوم تومورهای تخمدانی با منشا اپیتلیالی و هم استرومایی وجود دارند. در ۷۰ الی ۸۰ درصد بافت های سرطان اندومتر نیز گیرنده های استروژنی به میزان زیادی بیان می شوند (۱۲۴).

در مطالعات گوناگون بیان شده است که تغییرات آلی پلی مورفیسم های ژن گیرنده استروژن آلفا با اندومتریوز^۱، آدنومیوز^۲، لیومیوماتا^۳ در ارتباط است (۸۱)، اگرچه در این مطالعات توافق نظر وجود ندارد (۱۲۵، ۱۲۶). بررسی ها نشان می دهد ژنوتیپ PP در بیماران اندومتریوزی، آدنومیوز، لیومیوماتا کمتر از افراد نرمال دیده شده است و این نتیجه پیشنهاد می کند وجود آلل P نقش محافظت کننده برای جلوگیری از ابتلا به اندومتریوز، آدنومیوز، لیومیوماتا را دارد (۱۲۷، ۱۲۸). در مطالعات دیگر این توافق نظر وجود دارد که وجود آلل X با افزایش ریسک ابتلا به اندومتریوز یا لیومیوماتا در ارتباط است (۱۲۹، ۱۳۰).

استروژن ها از جمله هورمون هایی هستند که در زنان یائسه برای محافظت از تراکم استخوانی^۴ و جلوگیری از پوکی استخوان بسیار ضروری می باشند. مطالعات نشان می دهد زنان دارای ژنوتیپ PP از تراکم استخوانی بیشتری نسبت به ژنوتیپ های Pp و pp برخوردار هستند (۱۳۱)، اگرچه در زنان نژاد قفقاز این نظریه به اثبات نرسید. در رابطه با ژنوتیپ XX نیز اثر محافظتی در تراکم استخوان زنان یائسه به اثبات رسیده است (۱۳۲). این نتایج پیشنهاد می کند فعالیت استروژنیک بافتی در افرادی که حامل آلل P هستند بسیار قوی تر از افراد دارای آلل p می باشد. دلیل دیگری بر اثبات این نظریه مطالعه ای دیگری است که نشان می دهد زنان دارای ژنوتیپ PP بسیار بیشتر از افراد دیگر دچار مشکلات رحمی قبل از یائسگی و ایجاد خونریزی های شدید در دوران شروع یائسگی هستند (۱۳۳).

مطالعات اولیه در رابطه با مکانیسم تاثیر پلی مورفیسم موقعیت 397C/T- نشان می داد که این پلی مورفیسم می تواند بیان پروتئین و الگوی پردازش mRNA را تغییر دهد (۹۱). از آنجایی که این پلی مورفیسم در منطقه ی غیر کد شونده از ژن قرار گرفته است پس انتظار می رود که در مراحل رونویسی و بیان پروتئین تغییری ایجاد نکند. اما مطالعات نشان می دهد این دو پلی مورفیسم می توانند بر اتصال فاکتورهای رونویسی از جمله myb تاثیر گذاشته و باعث کاهش بیان ERα شوند. مکانیسم تاثیر این

¹ - endometriosis

² - adenomyosis

³ - leiomyomata

⁴ - bone mineral density (BMD)

SNP ها در کیفیت و کمیت mRNA رونویسی شده از ژن گیرنده استروژنی آلفا و پروتئین بیان شده آن، هنوز در دست بررسی می باشد. اسکوئیت^۱ و همکارانش نشان داده اند که این SNP ها (آلل های p و x) با کاهش سطح سرمی استرادیول در زنان یائسه در ارتباط می باشند (۱۳۴). تئوری آن ها برای توجیح این موضوع این است که، این SNP ها بیان یک گروه از آنزیم های ۱۷-بتا هیدروکسی استروئید دهیدروژناز^۲ را که در تبدیل استرون^۳ به استرادیول^۴ نقش دارند را تحت تاثیر قرار می دهند. البته این امکان نیز وجود دارد که این SNP ها با SNP های دیگری در ژن ERα در ارتباط باشند که آن ها می توانند بیان پروتئین ERα را تحت تاثیر قرار دهند. کاهش سطح استرادیول در زنان یائسه ای که حامل آلل p هستند معمولا همراه با کاهش بیان ERα می باشد، که منجر به ایجاد عوارض بالینی در فرد از جمله بیماری های قلبی می شود (۱۱۵). ما در بخشی از مطالعات خود به بررسی ارتباط این پلی مورفیسم ها و هورمون استرادیول پرداختیم و نتوانستیم ارتباط معنی داری بین آن ها پیدا کنیم. اگرچه تعداد سمپل های مورد مطالعه ما کم بود و مطالعه ای با تعداد سمپل بالاتر مورد نیاز است.

در تمام مطالعات با موضوع پلی مورفیسم های موقعیت 397C/T- و 351A/G- تفاوت در نتایج وجود دارد. این تفاوت ها باعث شده است که نتوان نتیجه گیری کلی و یا حتی پروتوکل درمانی واحدی را تعریف کرد.

مطالعه ای که اخیرا و در سال ۲۰۱۲ توسط هو^۵ و همکارانش بر روی زنان چینی صورت گرفته است، نتوانست ارتباط معنی داری بین دو پلی مورفیسم 1082G / A(RsaI) (rs1256049) و 1730 G/A (AluI) (rs4986938)، که بر روی ژن ESR2 واقع شده اند، را نشان دهد (۷۳). در مطالعه ای دیگر که در سال ۲۰۱۰ توسط هانا^۶ و همکارانش در کانادا صورت گرفت، به بررسی SNP های مختلف در رابطه با سقط مکرر پرداختند، آن ها نیز نتوانستند ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم موقعیت 1082G / A و RPL پیدا کنند (۷۱). همچنین در بررسی صورت گرفته در برزیل توسط آلسیو^۷ و همکارانش در سال

^۱ - Schuit

^۲ - 17β-hydroxysteroid dehydrogenase enzyme

^۳ - estrone

^۴ - estradiol

^۵ - Hu

^۶ - Hanna

^۷ - Aléssio

۲۰۰۸، زنان نژاد قفقاز و نژاد بومی برزیل، ارتباط معنی داری بین موقعیت های $1082G / A$ و $1730 G / A$ و RPL یافت نشد (۷۰). در بررسی انجام شده توسط پیندا و همکارانش در سال ۲۰۱۰ در جمعیت زنان اسپانیایی هیچ گونه ارتباط معنی داری بین دو پلی مورفیسم موقعیت های $1730 G / A$ و rs1256030 (C/T) و سقط مکرر یافت نشد (۶۸).

در جمعیت ایرانی مورد مطالعه ما به بررسی سه پلی مورفیسم rs4986938 G/A، rs1256049 G/A و rs1256030 C/T پرداخته شد، در پلی مورفیسم rs1256049 G/A اختلاف معنی داری مشاهده شد، و در رابطه با پلی مورفیسم rs4986938 G/A اختلاف معنی دار نبود، اگرچه ما تصور می کنیم با افزایش تعداد نمونه ها این اختلاف معنی دار می شود. اگرچه در پلی مورفیسم دیگر این اختلاف معنی دار نبود.

رسپتورهای استروژنی و آندروژنی از جمله فاکتورهای رونویسی هستند که با لیگاند مخصوص فعال می شوند، و سنتز RNA ها و یا پروتئین های مخصوصی را در مسیرهای متفاوتی از سیگنالینگ سلولی تنظیم می کنند که در نهایت منجر به تنظیم بیان ژن و رشد سلول می شود (۱۳۵). دو گیرنده ی استروژنی آلفا و بتا عکس العمل متفاوتی در مواجهه با استروژن ها دارند و به نظر می رسد، با افزایش سطح E2 میزان $ER\alpha$ کاهش یافته و بالعکس بیان $ER\beta$ در سلول افزایش می یابد. $ER\beta$ در تنظیم فعالیت آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز^۱ و سایر آنزیم های سم زدا^۲ دارای نقش مهمی می باشد. همچنین به نظر می رسد $ER\beta$ دارای نقش مهم و اساسی در محافظت سلول بر علیه استرس اکسیداتیو است (۱۳۶). به علت تعامل این گیرنده با اینترلوکین ۶ (IL-6) نقش آن در مکانیسم های التهابی مطرح شده و مورد بررسی قرار گرفته است (۱۳۷). بیان متفاوت $ER\beta$ در سلول های بافت چربی زنان و مردان مشاهده شده است و این بررسی ها بیان می کنند، بیان $ER\beta$ در بافت چربی زنان بالاتر از مردان می باشد، اگرچه هیچ تفاوتی در میزان بیان $ER\alpha$ مشاهده نشده است (۱۳۸). بیان بیشتر $ER\alpha$ در بافت سینه، و همچنین بیان بالاتر $ER\beta$ در بافت کلون می تواند توجیهی بر ایجاد نتایج متفاوت HRT توسط این گیرنده ها باشد (۱۳۹). بالاترین بیان $ER\beta$ و بیشترین mRNA مربوط به این گیرنده در سلول های تخمدان و گرانولوزا گزارش شده است (۴۴). تحقیقات بر روی موش های مونثی که ژن $ER\beta$ در آن ها knockout شده است، نشان

^۱ - glutathione S-transferases

^۲ - detoxifying enzymes

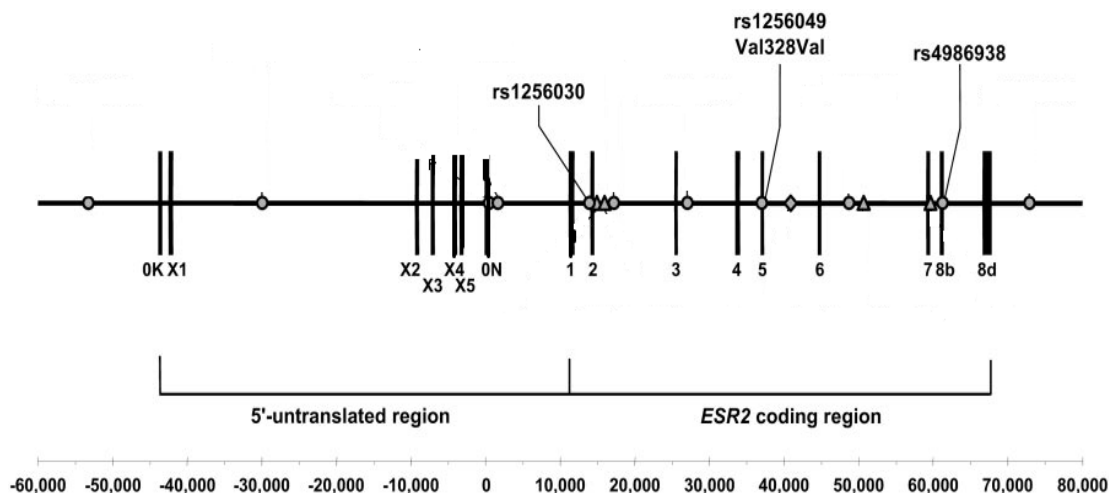
می دهد وجود $ER\beta$ برای تخمک گذاری نرمال بسیار ضروری می باشد، اگرچه با تحقیق بر این موش ها به نظر می رسد این گیرنده در بروز صفات ثانویه جنسی، باروری و شیردهی فاقد تاثیر و یا تاثیر اندک می باشند (۱۴۰).

تعداد زیادی از پلی مورفیسم های ژن $ESR2$ تا کنون مورد مطالعه قرار گرفته اند، اما مکانیسم عملکرد این پلی مورفیسم ها هنوز به اندازه $ESR1$ شناخته شده نیست. برخی از پلی مورفیسم ها ژن $ESR2$ می توانند فعالیت های گیرنده را تغییر داده و باعث ایجاد تاثیر در بافت ها در پاسخ به استروژن شوند (۱۴۱).

در این میان ما مروری داریم بر پلی مورفیسم $rs1256049\ G/A$ که در ناحیه LBD از ساختمان ژن و اگزون ۵ واقع شده و این تغییر $Synonymous$ ^۱ بوده یعنی باعث کد آمینواسید متفاوت نمی شود ($Val328Val$) و $rs4986938\ G/A$ که در ناحیه $3'$ ترجمه نشونده^۲ واقع در اگزون ۸ قرار دارد شده است (۹۴، ۱۴۲). بررسی ها نشان می دهد $rs4986938\ G/A$ می تواند پایداری RNA ژن $ESR2$ را تحت تاثیر قرار دهد (۱۴۳، ۱۴۴). هر دوی این پلی مورفیسم ها با شماری از بیماری ها شامل؛ سرطان سینه و آندومتریوم، سرطان پروستات، کاهش تراکم استخوان و بیماری های قلبی- عروقی در ارتباط می باشند. پلی مورفیسم $rs1256030\ C/T$ در ناحیه اینترون دو واقع شده و مطالعات در رابطه با مکانیسم و تاثیرات آن بسیار کم می باشد (شکل ۴-۲). ارتباط این پلی مورفیسم ها با سرطان کلون نیز گزارش شده است (۱۳۹، ۱۴۵). اگرچه پلی مورفیسم های مذکور قادر به ایجاد تغییر در آمینواسید نیستند، اما می توانند با سایر پلی مورفیسم های نواحی مختلف ژن که بر بیان ژن و یا فعالیت آن تاثیر گذار هستند ارتباط یا LD داشته باشند (۹۲).

¹ - synonymous change

² - 3'-untranslated region



شکل ۴-۲: ساختار ژن ESR2. ناحیه کد شونده شامل اگزون های ۷-۱ و اگزون ۸ می باشد که این اگزون به طور متناوب رونویسی می شود (۱۴۶). موقعیت پلی مورفیسم های مورد بررسی این مطالعه در ژن گیرنده استروژن بتا نشان داده شده است.

در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۰ بر روی زنان کره ای مبتلا به PCO انجام گرفت، مشخص شد پلی مورفیسم موقعیت 1730 G / A با این بیماری در ارتباط است (۱۴۲). به نظر می رسد، وجود آلل R در موقعیت 1082G / A با مشکلات تخمک گذاری و وزن بدن در ارتباط است (147). در مطالعه ای که در جمعیت آلمانی انجام شده است به ارتباط پلی مورفیسم های موقعیت 1082G / A و 1730 G / A با وزن بدن اشاره می کند (۱۴۷). در مطالعه ای دیگر در سال ۲۰۱۰ و ۲۰۱۱ ارتباط پلی مورفیسم موقعیت 1730 G / A با اندومتريوز و یا ناباروری مطرح شده است (۱۴۸، ۱۴۹).

امروزه مشخص شده است وجود SNP ها در ژنوم انسان، بیشترین شکل ایجاد تغییر در DNA می باشند، و می توانند مارکر مهمی در معرفی فاکتورهای ژنتیکی مرتبط با بیماری های پیچیده و چند عاملی باشند (۱۵۰). به علاوه به نظر می رسد وجود SNP های متفاوت در طول یک ژن می تواند بر فولدینگ mRNA حاصل تاثیر بگذارد (۱۵۱). این mRNA ها مختلف احتمالا دارای فعالیت های بیولوژیک می باشند که می توانند بر سایر محتویات سلولی تاثیر بگذارند.

۴-۶- نتیجه گیری

با تمام این توضیحات، ارتباط پلی مورفیسم های ژنتیکی با سقط مکرر هنوز به طور کامل مشخص نیست و مطالعات بیشتری در این رابطه نیاز است. همان طور که می دانیم عوامل متعددی در سقط مکرر نقش دارند، بنابراین مشخص کردن عوامل اصلی در این رابطه تا حدی دشوار می باشد.

اگرچه به نظر می رسد سقط مکرر، یک بیماری نسیت و بهتر است به آن سندرم اطلاق گردد. عوامل متعددی در ایجاد سقط مکرر نقش دارند بنابراین، می توان اینگونه استنباط کرد که احتمالاً پلی مورفیسم های ژن های مختلف می توانند با RPL در ارتباط می باشند. نقصی که در رابطه با مطالعات پلی مورفیسم ژن ها و RPL می توان در نظر گرفت، این است که تاثیر SNP ها به تنهایی بر RPL بررسی شده است و بهتر است در مطالعات به بررسی ترکیب این SNP هادر ارتباط با سقط پرداخته شود.

به علاوه، مطالعات ژنتیکی پیچیده هستند و نتایج حاصل از آن ها باید به روش های مختلف بررسی و تایید گردند. اگرچه یک سری از مطالعات پیچیدگی های خود را داشته و امکان تکرار و مقایسه ی آن ها وجود ندارد. تفاوت های قومی احتمالاً می توانند بر فرکانس های ژنوتپی تاثیر گذار باشند و این عامل مهم می تواند نتایج مطالعات را تحت تاثیر قرار دهد. بنابراین یک SNP می تواند در یک جمعیت با RPL در ارتباط باشد و در جمعیتی دیگر بدون تاثیر باشد.

مشکل اصلی مطالعاتی که تا به امروز انجام شده است، تعداد افراد مورد بررسی می باشد. تعداد محدود افراد RPL در جامعه باعث کمبود نمونه های بررسی شده در تحقیقات می شود و این خود عاملی مهم در کاهش قدرت آماری داده ها و معنی دار نشدن تحقیقات می باشد. مساله مهم و اساسی در مطالعات پلی مورفیسم کرکترایز کردن گروه مورد مطالعه می باشد. بهتر است در این مطالعات معیار های ورود و خروج به خوبی تعریف شوند.

اگرچه مطالعه ی ما و اکثر مطالعات در رابطه با این SNP با برخی از مطالعات همخوانی نداشت، با این حال ما نمی توانیم تفاوت های قومی در استعداد ابتلا به بیماری را مد نظر قرار ندهیم. مطالعات گسترده تری در رابطه با نقش دقیق پلی مورفیسم گیرنده های هورمون های جنسی و افزایش ریسک سقط مکرر مورد نیاز است، و تلاش بر این است تا بتوان در آینده راهکارهای مفید و استراتژی های جدید درمانی از جمله هورمون درمانی را برای بیماران سقط مکرر و جلوگیری از این عارضه ارائه داد.

در مطالعه حاضر ۵ موتاسیون ژن های گیرنده های استروژنی در ۲۴۹ بیمار سقط مکرر و ۱۰۵ فرد سالم مورد بررسی قرار گرفته است، که به طور کلی تنها در یک پلی مورفیسم ژن ESR2 ارتباط با سقط مکرر دیده شد.

از آنجایی که پایان هر بررسی و آزمایش می تواند شروعی باشد برای مطالعات جدیدتر، لذا در انتها به پیشنهاداتی اشاره می شود که می توانند دیدگاه های جدیدی در رابطه با بهتر شدن مسیر پیدا کردن عواملی دخیل در سندرم سقط مکرر به ما ارائه دهند.

۴-۷- پیشنهادات

۱- در مطالعات اپیدمیولوژیکی، هرچه اندازه جمعیت مورد مطالعه بزرگتر باشد، نتایج آماری حاصله محکم تر و مستدل تر می باشد. از این رو افزایش تعداد بیماران می تواند بیانگر مطالعه دقیق تر این بیماران در ایران باشد.

۲- مطالعه پلی مورفیسم های دیگر این دو ژن و سایر گیرنده های هورمونی، می توانند دیدگاه وسیع تر و کامل تری را در مورد تفاوت های ژنتیکی بیماران ایرانی در مقایسه با افراد سالم در اختیار ما قرار می دهد.

امیدواریم این تحقیق گامی باشد هر چند کوچک در جهت پیشرفت تحقیقات بعدی راجع به این بیماری و سایر بیماری های بحث شده در این تحقیق در کشور عزیزمان ایران، و آرزومندیم در آینده ای نزدیک علت و درمان این بیماری شناخته شود تا کسی بیش از این، از این بیماری در رنج و عذاب نباشد.

References:

1. Lee RM, Silver RM. Recurrent pregnancy loss: summary and clinical recommendations. *Seminars in reproductive medicine*. 2000;18(4):433-40. Epub 2001/05/18.
2. Sierra S, Stephenson M. Genetics of recurrent pregnancy loss. *Seminars in reproductive medicine*. 2006;24(1):17-24. Epub 2006/01/19.
3. Reiss HE, Brinsden PR. *Reproductive medicine : from A to Z*. Oxford ; New York: Oxford University Press; 1998. x, 152 p. p.
4. Beever CL, Stephenson MD, Penaherrera MS, Jiang RH, Kalousek DK, Hayden M, et al. Skewed X-chromosome inactivation is associated with trisomy in women ascertained on the basis of recurrent spontaneous abortion or chromosomally abnormal pregnancies. *American journal of human genetics*. 2003;72(2):399-407. Epub 2002/12/24.
5. Lanasa MC, Hogge WA. X chromosome defects as an etiology of recurrent spontaneous abortion. *Seminars in reproductive medicine*. 2000;18(1):97-103. Epub 2001/04/13.
6. Speroff L, Fritz MA. *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. x, 1334 p. p.
7. Laird SM, Tuckerman EM, Cork BA, Linjawi S, Blakemore AI, Li TC. A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage. *Human reproduction update*. 2003;9(2):163-74. Epub 2003/05/20.
8. Traina E, Daher S, Moron AF, Sun SY, Franchim CS, Mattar R. Polymorphisms in VEGF, progesterone receptor and IL-1 receptor genes in women with recurrent spontaneous abortion. *Journal of reproductive immunology*. 2011;88(1):53-7. Epub 2010/10/20.
9. Lim KJ, Odukoya OA, Li TC, Cooke ID. Cytokines and immuno-endocrine factors in recurrent miscarriage. *Human reproduction update*. 1996;2(6):469-81. Epub 1996/11/01.
10. Michels TC, Tiu AY. Second trimester pregnancy loss. *American family physician*. 2007;76(9):1341-6. Epub 2007/11/21.
11. Ghosh K, Shetty S, Vora S, Salvi V. Successful pregnancy outcome in women with bad obstetric history and recurrent fetal loss due to thrombophilia: effect of unfractionated heparin and low-molecular weight heparin. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2008;14(2):174-9. Epub 2007/12/28.
12. Sadler TW, Langman J. *Langman's medical embryology*. 11th ed. Baltimore, Md.: Lippincott William & Wilkins; 2009. p. p.
13. Ogasawara M, Aoki K, Okada S, Suzumori K. Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. *Fertility and sterility*. 2000;73(2):300-4. Epub 2000/02/24.
14. Sullivan AE, Silver RM, LaCoursiere DY, Porter TF, Branch DW. Recurrent fetal aneuploidy and recurrent miscarriage. *Obstetrics and gynecology*. 2004;104(4):784-8. Epub 2004/10/02.
15. Berek JS, Novak E. *Berek & Novak's gynecology*. 14th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. xxii, 1671 p. p.
16. Ryan KJ, Kistner RW. *Kistner's gynecology and women's health*. 7th ed. St. Louis, Mo.: Mosby; 1999. xxvi, 660 p. p.

17. Stagnaro-Green A, Roman SH, Cobin RH, el-Harazy E, Alvarez-Marfany M, Davies TF. Detection of at-risk pregnancy by means of highly sensitive assays for thyroid autoantibodies. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1990;264(11):1422-5. Epub 1990/09/19.
18. Aoki K, Kajiura S, Matsumoto Y, Ogasawara M, Okada S, Yagami Y, et al. Preconceptional natural-killer-cell activity as a predictor of miscarriage. *Lancet*. 1995;345(8961):1340-2. Epub 1995/05/27.
19. Quenby S, Farquharson RG, Dawood F, Hughes AM, Topping J. Recurrent miscarriage and long-term thrombosis risk: a case-control study. *Hum Reprod*. 2005;20(6):1729-32. Epub 2005/03/19.
20. Dosiou C, Giudice LC. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. *Endocrine reviews*. 2005;26(1):44-62. Epub 2005/02/04.
21. Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Sonta S, Makino T, Suzumori K. Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage. *Hum Reprod*. 2005;20(8):2325-9. Epub 2005/06/11.
22. Gerhard I, Waibel S, Daniel V, Runnebaum B. Impact of heavy metals on hormonal and immunological factors in women with repeated miscarriages. *Human reproduction update*. 1998;4(3):301-9. Epub 1998/09/19.
23. Hogge WA, Byrnes AL, Lanasa MC, Surti U. The clinical use of karyotyping spontaneous abortions. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2003;189(2):397-400; discussion -2. Epub 2003/10/02.
24. Puscheck EE, Jeyendran RS. The impact of male factor on recurrent pregnancy loss. *Current opinion in obstetrics & gynecology*. 2007;19(3):222-8. Epub 2007/05/15.
25. Purves WK, Orians GH, Heller HC. *Life, the science of biology*. 4th ed. Sunderland, Mass.

Salt Lake City, Utah: Sinauer Associates ;

W.H. Freeman; 1995. 1195, 34, 2, 5, 41 p. p.

26. Heffner LJ, Schust DJ. *The reproductive system at a glance*. 3rd ed. Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2010. 125 p. p.
27. Kovacs P, Matyas S, Boda K, Kaali SG. The effect of endometrial thickness on IVF/ICSI outcome. *Hum Reprod*. 2003;18(11):2337-41. Epub 2003/10/31.
28. Somboonporn W, Davis SR. Testosterone effects on the breast: implications for testosterone therapy for women. *Endocrine reviews*. 2004;25(3):374-88. Epub 2004/06/08.
29. Becker KL. *Principles and practice of endocrinology and metabolism*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. xxxiv, 2477 p. p.
30. Maruyama Y, Aoki N, Suzuki Y, Ohno Y, Imamura M, Saika T, et al. Sex-steroid-binding plasma protein (SBP), testosterone, oestradiol and dehydroepiandrosterone (DHEA) in prepuberty and puberty. *Acta endocrinologica*. 1987;114(1):60-7. Epub 1987/01/01.
31. Anderson DC, Lasley BL, Risher RA, Shepherd JH, Newman L, Hendrickx AG. Transplacental gradients of sex-hormone-binding globulin in human and simian pregnancy. *Clinical endocrinology*. 1976;5(6):657-69. Epub 1976/11/01.
32. Ryan KJ. Biochemistry of aromatase: significance to female reproductive physiology. *Cancer research*. 1982;42(8 Suppl):3342s-4s. Epub 1982/08/01.

33. Meldrum DR. Female reproductive aging--ovarian and uterine factors. *Fertility and sterility*. 1993;59(1):1-5. Epub 1993/01/01.
34. Santen RJ, Song RX, Masamura S, Yue W, Fan P, Sogon T, et al. Adaptation to estradiol deprivation causes up-regulation of growth factor pathways and hypersensitivity to estradiol in breast cancer cells. *Advances in experimental medicine and biology*. 2008;630:19-34. Epub 2008/07/22.
35. Nelson LR, Bulun SE. Estrogen production and action. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2001;45(3 Suppl):S116-24. Epub 2001/08/21.
36. Pepe GJ, Albrecht ED. Actions of placental and fetal adrenal steroid hormones in primate pregnancy. *Endocrine reviews*. 1995;16(5):608-48. Epub 1995/10/01.
37. Schindler AE. *Endocrinology of pregnancy: consequences for the diagnosis and treatment of pregnancy disorders*. Elsevier; 2005. p. 386-8.
38. Schindler AE. *Endocrinology of pregnancy: consequences for the diagnosis and treatment of pregnancy disorders*. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2005;97(5):386-8. Epub 2005/10/12.
39. Giudice LC, Ferenczy A. The endometrial cycle. 1996. p. 271-300.
40. Perrot-Applanat M, Groyer-Picard MT, Garcia E, Lorenzo F, Milgrom E. Immunocytochemical demonstration of estrogen and progesterone receptors in muscle cells of uterine arteries in rabbits and humans. *Endocrine Soc*; 1988. p. 1511.
41. Perrot-Applanat M, Deng M, Fernandez H, Lelaidier C, Meduri G, Bouchard P. Immunohistochemical localization of estradiol and progesterone receptors in human uterus throughout pregnancy: expression in endometrial blood vessels. *Endocrine Soc*; 1994. p. 216.
42. Ma WG, Song H, Das SK, Paria BC, Dey SK. Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(5):2963-8. Epub 2003/02/26.
43. Jensen EV, Jordan VC. The estrogen receptor: a model for molecular medicine. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003;9(6):1980-9. Epub 2003/06/11.
44. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(12):5925-30. Epub 1996/06/11.
45. Silvestri S, Thomsen AB, Gozzini A, Bagger Y, Christiansen C, Brandi ML. Estrogen receptor alpha and beta polymorphisms: is there an association with bone mineral density, plasma lipids, and response to postmenopausal hormone therapy? *Menopause*. 2006;13(3):451-61. Epub 2006/06/01.
46. Kumar R, Thompson EB. The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids*. 1999;64(5):310-9. Epub 1999/07/16.
47. Klinge CM. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids*. 2000;65(5):227-51. Epub 2000/04/07.
48. Warnmark A, Treuter E, Wright AP, Gustafsson JA. Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Mol Endocrinol*. 2003;17(10):1901-9. Epub 2003/08/02.

49. Li X, Huang J, Yi P, Bambara RA, Hilf R, Muyan M. Single-chain estrogen receptors (ERs) reveal that the ERalpha/beta heterodimer emulates functions of the ERalpha dimer in genomic estrogen signaling pathways. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(17):7681-94. Epub 2004/08/18.
50. Linja MJ, Porkka KP, Kang Z, Savinainen KJ, Janne OA, Tammela TL, et al. Expression of androgen receptor coregulators in prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10(3):1032-40. Epub 2004/02/12.
51. Koehler KF, Helguero LA, Haldosen LA, Warner M, Gustafsson JA. Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. *Endocrine reviews*. 2005;26(3):465-78.
52. Herynk MH, Fuqua SAW. Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocrine Soc*; 2004. p. 869-98.
53. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *National Acad Sciences*; 1996. p. 5925.
54. Kuiper GGJM, Gustafsson JÅ. The novel estrogen receptor-[beta] subtype: potential role in the cell-and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. *Elsevier*; 1997. p. 87-90.
55. Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien KAJ, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, et al. Human estrogen receptor β -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *Endocrine Soc*; 1997. p. 4258.
56. Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, et al. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature Publishing Group*; 1986.
57. Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *American Association for the Advancement of Science*; 1986. p. 1150.
58. Grandien K. Determination of transcription start sites in the human estrogen receptor gene and identification of a novel, tissue-specific, estrogen receptor-mRNA isoform. *Elsevier*; 1996. p. 207-12.
59. Tan NS, Lam TJ, Ding JL. The first contiguous estrogen receptor gene from a fish, *Oreochromis aureus*: evidence for multiple transcripts. *Elsevier*; 1996. p. 177-92.
60. Grandien K. Determination of transcription start sites in the human estrogen receptor gene and identification of a novel, tissue-specific, estrogen receptor-mRNA isoform. *Molecular and cellular endocrinology*. 1996;116(2):207-12. Epub 1996/02/05.
61. Lecce G, Meduri G, Ancelin M, Bergeron C, Perrot-Applanat M. Presence of estrogen receptor β in the human endometrium through the cycle: expression in glandular, stromal, and vascular cells. *Endocrine Soc*; 2001. p. 1379.
62. Krikun G, Schatz F, Taylor R, Critchley HOD, Rogers PAW, Huang J, et al. Endometrial endothelial cell steroid receptor expression and steroid effects on gene expression. *Endocrine Soc*; 2005. p. 1812.
63. Adeyemo O, Jeyakumar H. Plasma progesterone, estradiol-17 beta and testosterone in maternal and cord blood, and maternal human chorionic gonadotropin at parturition. 1993. p. 55.
64. Sarda IR, Gorwill RH. Hormonal studies in pregnancy. I. Total unconjugated estrogens in maternal peripheral vein, cord vein, and cord artery serum at delivery. 1976. p. 234.

65. Bukovsky A, Cekanova M, Caudle MR, Wimalasena J, Foster JS, Henley DC, et al. Expression and localization of estrogen receptor-alpha protein in normal and abnormal term placentae and stimulation of trophoblast differentiation by estradiol. 2003. p. 13.
66. Frazier ME, Johnson GM, Thomassen DG, Oliver CE, Patrinos A. Realizing the potential of the genome revolution: the genomes to life program. *Science*. 2003;300(5617):290-3. Epub 2003/04/12.
67. Lehrer S, Levine E, Savoretti P, Cropley J, Thung SN, Song HK, et al. Oestrogen and progesterone receptor dissociation and family history of breast cancer. *Lancet*. 1992;339(8801):1108-9. Epub 1992/05/02.
68. Pineda B, Hermenegildo C, Tarin JJ, Laporta P, Cano A, Garcia-Perez MA. Alleles and haplotypes of the estrogen receptor alpha gene are associated with an increased risk of spontaneous abortion. *Fertility and sterility*. 2010;93(6):1809-15. Epub 2009/02/10.
69. Gerhardt A, Scharf RE, Mikat-Drozdzyński B, Krussel JS, Bender HG, Zotz RB. Maternal IVS1-401 T allele of the estrogen receptor alpha is an independent predictor of late fetal loss. *Fertility and sterility*. 2006;86(2):448-53. Epub 2006/06/07.
70. Alessio AM, Siqueira LH, de Carvalho EC, Barini R, Mansur Ade P, Hoehr NF, et al. Estrogen receptor alpha and beta gene polymorphisms are not risk factors for recurrent miscarriage in a Brazilian population. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2008;14(2):180-5. Epub 2007/09/27.
71. Hanna CW, Bretherick KL, Liu CC, Stephenson MD, Robinson WP. Genetic variation within the hypothalamus-pituitary-ovarian axis in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod*. 2010;25(10):2664-71. Epub 2010/08/19.
72. Berkowitz GS, Stone JL, Lehrer SP, Marcus M, Lapinski RH, Schachter BS. An estrogen receptor genetic polymorphism and the risk of primary and secondary recurrent spontaneous abortion. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1994;171(6):1579-84. Epub 1994/12/01.
73. Hu J, Wang J, Xiang H, Li Z, Wang B, Cao Y, et al. Association of polymorphisms in the estrogen receptor beta (ESR2) with unexplained recurrent spontaneous abortion (URSA) in Chinese population. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet*. 2012;25(9):1727-9. Epub 2012/04/03.
74. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, Thompson MW. *Thompson & Thompson genetics in medicine*. 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2001. xi, 444 p. p.
75. Fisher RA. *The genetical theory of natural selection*. Oxford,: The Clarendon press; 1930. xiv, 272 p. p.
76. Corbo RM, Ulizzi L, Piombo L, Martinez-Labarga C, De Stefano GF, Scacchi R. Estrogen receptor alpha polymorphisms and fertility in populations with different reproductive patterns. *Molecular human reproduction*. 2007;13(8):537-40. Epub 2007/06/09.
77. Sowers M, Jannausch ML, Liang W, Willing M. Estrogen receptor genotypes and their association with the 10-year changes in bone mineral density and osteocalcin concentrations. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004;89(2):733-9. Epub 2004/02/07.

78. Abbasi S, Nouri M, Azimi C. Estrogen receptor genes variations and breast cancer risk in Iran. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2012;5(4):332-41. Epub 2012/09/21.
79. Brandi ML, Becherini L, Gennari L, Racchi M, Bianchetti A, Nacmias B, et al. Association of the estrogen receptor alpha gene polymorphisms with sporadic Alzheimer's disease. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999;265(2):335-8. Epub 1999/11/24.
80. Dunning AM, Healey CS, Pharoah PD, Teare MD, Ponder BA, Easton DF. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 1999;8(10):843-54. Epub 1999/11/05.
81. Kitawaki J, Obayashi H, Ishihara H, Koshiba H, Kusuki I, Kado N, et al. Oestrogen receptor-alpha gene polymorphism is associated with endometriosis, adenomyosis and leiomyomata. *Hum Reprod*. 2001;16(1):51-5. Epub 2001/01/05.
82. Liu ZH, Cheng ZH, Gong RJ, Liu H, Liu D, Li LS. Sex differences in estrogen receptor gene polymorphism and its association with lupus nephritis in Chinese. *Nephron*. 2002;90(2):174-80. Epub 2002/01/31.
83. Massart F, Reginster JY, Brandi ML. Genetics of menopause-associated diseases. *Maturitas*. 2001;40(2):103-16. Epub 2001/11/22.
84. Middleton PG, Norden J, Cullup H, Cavet J, Jackson GH, Taylor PR, et al. Oestrogen receptor alpha gene polymorphism associates with occurrence of graft-versus-host disease and reduced survival in HLA-matched sib-allo BMT. *Bone marrow transplantation*. 2003;32(1):41-7. Epub 2003/06/20.
85. Shearman AM, Cooper JA, Kotwinski PJ, Miller GJ, Humphries SE, Ardlie KG, et al. Estrogen receptor alpha gene variation is associated with risk of myocardial infarction in more than seven thousand men from five cohorts. *Circulation research*. 2006;98(5):590-2. Epub 2006/02/18.
86. Tanaka Y, Sasaki M, Kaneuchi M, Shiina H, Igawa M, Dahiya R. Polymorphisms of estrogen receptor alpha in prostate cancer. *Molecular carcinogenesis*. 2003;37(4):202-8. Epub 2003/08/02.
87. Tempfer CB, Schneeberger C, Huber JC. Applications of polymorphisms and pharmacogenomics in obstetrics and gynecology. *Pharmacogenomics*. 2004;5(1):57-65. Epub 2003/12/20.
88. Yoo KY, Kang D. Current researches on breast cancer epidemiology in Korea. *Breast Cancer*. 2003;10(4):289-93. Epub 2003/11/25.
89. Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology*. 1997;138(11):4613-21. Epub 1997/11/05.
90. Emmen JM, Korach KS. Estrogen receptor knockout mice: phenotypes in the female reproductive tract. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*. 2003;17(2):169-76. Epub 2003/05/10.
91. Hill SM, Fuqua SA, Chamness GC, Greene GL, McGuire WL. Estrogen receptor expression in human breast cancer associated with an estrogen receptor gene restriction fragment length polymorphism. *Cancer research*. 1989;49(1):145-8. Epub 1989/01/01.

92. Yaich L, Dupont WD, Cavener DR, Parl FF. Analysis of the PvuII restriction fragment-length polymorphism and exon structure of the estrogen receptor gene in breast cancer and peripheral blood. *Cancer research*. 1992;52(1):77-83. Epub 1992/01/01.
93. Jakimiuk A, Nowicka M, Bogusiewicz M, Adamiak A, Skorupski P, Miotla P, et al. Prevalence of estrogen receptor alpha PvuII and XbaI polymorphism in population of Polish postmenopausal women. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*. 2007;45(4):331-8. Epub 2008/01/01.
94. Gennari L, Merlotti D, De Paola V, Calabro A, Becherini L, Martini G, et al. Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: a HuGE review. *American journal of epidemiology*. 2005;161(4):307-20. Epub 2005/02/05.
95. Laurie CC, Stam LF. The effect of an intronic polymorphism on alcohol dehydrogenase expression in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 1994;138(2):379-85. Epub 1994/10/01.
96. Bornstein P, McKay J, Morishima JK, Devarayalu S, Gelinas RE. Regulatory elements in the first intron contribute to transcriptional control of the human alpha 1(I) collagen gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(24):8869-73. Epub 1987/12/01.
97. Zhai Y, Zhou G, Deng G, Xie W, Dong X, Zhang X, et al. Estrogen receptor alpha polymorphisms associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus carriers. *Gastroenterology*. 2006;130(7):2001-9. Epub 2006/06/10.
98. Kobayashi S, Inoue S, Hosoi T, Ouchi Y, Shiraki M, Orimo H. Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1996;11(3):306-11. Epub 1996/03/01.
99. Yamada Y, Ando F, Niino N, Ohta S, Shimokata H. Association of polymorphisms of the estrogen receptor alpha gene with bone mineral density of the femoral neck in elderly Japanese women. *J Mol Med (Berl)*. 2002;80(7):452-60. Epub 2002/07/12.
100. Han K, Choi J, Moon I, Yoon H, Han I, Min H, et al. Non-association of estrogen receptor genotypes with bone mineral density and bone turnover in Korean pre-, peri-, and postmenopausal women. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 1999;9(4):290-5. Epub 1999/11/07.
101. Bagger YZ, Jorgensen HL, Heegaard AM, Bayer L, Hansen L, Hassager C. No major effect of estrogen receptor gene polymorphisms on bone mineral density or bone loss in postmenopausal Danish women. *Bone*. 2000;26(2):111-6. Epub 2000/03/25.
102. van Meurs JB, Schuit SC, Weel AE, van der Klift M, Bergink AP, Arp PP, et al. Association of 5' estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density, vertebral bone area and fracture risk. *Human molecular genetics*. 2003;12(14):1745-54. Epub 2003/07/03.
103. Albagha OM, McGuigan FE, Reid DM, Ralston SH. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and bone mineral density: haplotype analysis in women from the United Kingdom. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2001;16(1):128-34. Epub 2001/01/10.
104. Becherini L, Gennari L, Masi L, Mansani R, Massart F, Morelli A, et al. Evidence of a linkage disequilibrium between polymorphisms in the human estrogen receptor alpha gene and

their relationship to bone mass variation in postmenopausal Italian women. *Human molecular genetics*. 2000;9(13):2043-50. Epub 2000/08/15.

105. Patel MS, Cole DE, Smith JD, Hawker GA, Wong B, Trang H, et al. Alleles of the estrogen receptor alpha-gene and an estrogen receptor cotranscriptional activator gene, amplified in breast cancer-1 (AIB1), are associated with quantitative calcaneal ultrasound. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2000;15(11):2231-9. Epub 2000/11/25.

106. Kok HS, van Asselt KM, van der Schouw YT, Peeters PH, Wijmenga C. Genetic studies to identify genes underlying menopausal age. *Human reproduction update*. 2005;11(5):483-93. Epub 2005/07/19.

107. Kok HS, Onland-Moret NC, van Asselt KM, van Gils CH, van der Schouw YT, Grobbee DE, et al. No association of estrogen receptor alpha and cytochrome P450c17alpha polymorphisms with age at menopause in a Dutch cohort. *Hum Reprod*. 2005;20(2):536-42. Epub 2004/11/13.

108. Gorai I, Tanaka K, Inada M, Morinaga H, Uchiyama Y, Kikuchi R, et al. Estrogen-metabolizing gene polymorphisms, but not estrogen receptor-alpha gene polymorphisms, are associated with the onset of menarche in healthy postmenopausal Japanese women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(2):799-803. Epub 2003/02/08.

109. Koivu TA, Fan YM, Mattila KM, Dastidar P, Jokela H, Nikkari ST, et al. The effect of hormone replacement therapy on atherosclerotic severity in relation to ESR1 genotype in postmenopausal women. *Maturitas*. 2003;44(1):29-38. Epub 2003/02/06.

110. Salmen T, Heikkinen AM, Mahonen A, Kroger H, Komulainen M, Saarikoski S, et al. The protective effect of hormone-replacement therapy on fracture risk is modulated by estrogen receptor alpha genotype in early postmenopausal women. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2000;15(12):2479-86. Epub 2000/12/29.

111. Herrington DM, Howard TD, Brosnihan KB, McDonnell DP, Li X, Hawkins GA, et al. Common estrogen receptor polymorphism augments effects of hormone replacement therapy on E-selectin but not C-reactive protein. *Circulation*. 2002;105(16):1879-82. Epub 2002/05/09.

112. Herrington DM, Howard TD, Hawkins GA, Reboussin DM, Xu J, Zheng SL, et al. Estrogen-receptor polymorphisms and effects of estrogen replacement on high-density lipoprotein cholesterol in women with coronary disease. *The New England journal of medicine*. 2002;346(13):967-74. Epub 2002/03/29.

113. Nogueira-de-Souza NC, Guerreiro da Silva ID, Carvalho CV, Pulchinelli A, Haidar MA, Baracat EC, et al. Effect of estrogen receptor-alpha (ESR1) gene polymorphism on high density lipoprotein levels in response to hormone replacement therapy. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 2009;42(12):1138-42. Epub 2009/11/26.

114. Lamon-Fava S, Asztalos BF, Howard TD, Reboussin DM, Horvath KV, Schaefer EJ, et al. Association of polymorphisms in genes involved in lipoprotein metabolism with plasma concentrations of remnant lipoproteins and HDL subpopulations before and after hormone therapy in postmenopausal women. *Clinical endocrinology*. 2010;72(2):169-75. Epub 2009/06/06.

115. Sai AJ, Gallagher JC, Fang X. Effect of hormone therapy and calcitriol on serum lipid profile in postmenopausal older women: association with estrogen receptor-alpha genotypes. *Menopause*. 2011;18(10):1101-12. Epub 2011/06/30.
116. Nordstrom P, Glader CA, Dahlen G, Birgander LS, Lorentzon R, Waldenstrom A, et al. Oestrogen receptor alpha gene polymorphism is related to aortic valve sclerosis in postmenopausal women. *Journal of internal medicine*. 2003;254(2):140-6. Epub 2003/07/16.
117. Schuit SC, Oei HH, Witteman JC, Geurts van Kessel CH, van Meurs JB, Nijhuis RL, et al. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and risk of myocardial infarction. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2004;291(24):2969-77. Epub 2004/06/24.
118. Lu H, Higashikata T, Inazu A, Nohara A, Yu W, Shimizu M, et al. Association of estrogen receptor-alpha gene polymorphisms with coronary artery disease in patients with familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2002;22(5):817-23. Epub 2002/05/15.
119. Koch W, Hoppmann P, Pfeufer A, Mueller JC, Schomig A, Kastrati A. No replication of association between estrogen receptor alpha gene polymorphisms and susceptibility to myocardial infarction in a large sample of patients of European descent. *Circulation*. 2005;112(14):2138-42. Epub 2005/10/06.
120. Lawlor DA, Timpson N, Ebrahim S, Day IN, Smith GD. The association of oestrogen receptor alpha-haplotypes with cardiovascular risk factors in the British Women's Heart and Health Study. *European heart journal*. 2006;27(13):1597-604. Epub 2006/03/23.
121. Andersen TI, Heimdal KR, Skrede M, Tveit K, Berg K, Borresen AL. Oestrogen receptor (ESR) polymorphisms and breast cancer susceptibility. *Human genetics*. 1994;94(6):665-70. Epub 1994/12/01.
122. Weiderpass E, Persson I, Melhus H, Wedren S, Kindmark A, Baron JA. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and endometrial cancer risk. *Carcinogenesis*. 2000;21(4):623-7. Epub 2000/04/07.
123. Stavrou I, Zois C, Ioannidis JP, Tsatsoulis A. Association of polymorphisms of the oestrogen receptor alpha gene with the age of menarche. *Hum Reprod*. 2002;17(4):1101-5. Epub 2002/04/02.
124. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(3):561-70. Epub 2006/03/03.
125. Li Y, Liu F, Tan SQ, Wang Y, Li SW. Estrogen receptor-alpha gene PvuII (T/C) and XbaI (A/G) polymorphisms and endometriosis risk: a meta-analysis. *Gene*. 2012;508(1):41-8. Epub 2012/08/15.
126. Hu X, Zhou Y, Feng Q, Wang R, Su L, Long J, et al. Association of endometriosis risk and genetic polymorphisms involving biosynthesis of sex steroids and their receptors: an updating meta-analysis. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2012;164(1):1-9. Epub 2012/05/23.
127. Govindan S, Shaik NA, Vedicherla B, Kodati V, Rao KP, Hasan Q. Estrogen receptor-alpha gene (T/C) Pvu II polymorphism in endometriosis and uterine fibroids. *Disease markers*. 2009;26(4):149-54. Epub 2009/09/05.
128. Georgiou I, Syrrou M, Bouba I, Dalkalitsis N, Paschopoulos M, Navrozoglou I, et al. Association of estrogen receptor gene polymorphisms with endometriosis. *Fertility and sterility*. 1999;72(1):164-6. Epub 1999/07/31.

129. Hsieh YY, Wang YK, Chang CC, Lin CS. Estrogen receptor alpha-351 XbaI*G and -397 PvuII*C-related genotypes and alleles are associated with higher susceptibilities of endometriosis and leiomyoma. *Molecular human reproduction*. 2007;13(2):117-22. Epub 2006/11/24.
130. Xie J, Wang S, He B, Pan Y, Li Y, Zeng Q, et al. Association of estrogen receptor alpha and interleukin-10 gene polymorphisms with endometriosis in a Chinese population. *Fertility and sterility*. 2009;92(1):54-60. Epub 2008/08/09.
131. Kurt O, Yilmaz-Aydogan H, Uyar M, Isbir T, Seyhan MF, Can A. Evaluation of ERalpha and VDR gene polymorphisms in relation to bone mineral density in Turkish postmenopausal women. *Molecular biology reports*. 2012;39(6):6723-30. Epub 2012/02/09.
132. Wang KJ, Shi DQ, Sun LS, Jiang X, Lu YY, Dai J, et al. Association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density: a meta-analysis. *Chinese medical journal*. 2012;125(14):2589-97. Epub 2012/08/14.
133. Weel AE, Uitterlinden AG, Westendorp IC, Burger H, Schuit SC, Hofman A, et al. Estrogen receptor polymorphism predicts the onset of natural and surgical menopause. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1999;84(9):3146-50. Epub 1999/09/16.
134. Schuit SC, de Jong FH, Stolk L, Koek WN, van Meurs JB, Schoofs MW, et al. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms are associated with estradiol levels in postmenopausal women. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2005;153(2):327-34. Epub 2005/08/03.
135. Tutton PJ, Barkla DH. Steroid hormones as regulators of the proliferative activity of normal and neoplastic intestinal epithelial cells (review). *Anticancer research*. 1988;8(3):451-6. Epub 1988/05/01.
136. Montano MM, Deng H, Liu M, Sun X, Singal R. Transcriptional regulation by the estrogen receptor of antioxidative stress enzymes and its functional implications. *Oncogene*. 2004;23(14):2442-53. Epub 2003/12/17.
137. Stein B, Yang MX. Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and C/EBP beta. *Molecular and cellular biology*. 1995;15(9):4971-9. Epub 1995/09/01.
138. Dieudonne MN, Leneveu MC, Giudicelli Y, Pecquery R. Evidence for functional estrogen receptors alpha and beta in human adipose cells: regional specificities and regulation by estrogens. *American journal of physiology Cell physiology*. 2004;286(3):C655-61. Epub 2004/02/06.
139. Slattery ML, Sweeney C, Murtaugh M, Ma KN, Wolff RK, Potter JD, et al. Associations between ERalpha, ERbeta, and AR genotypes and colon and rectal cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2005;14(12):2936-42. Epub 2005/12/21.
140. Kreege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, et al. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(26):15677-82. Epub 1998/12/23.
141. Hall JM, Couse JF, Korach KS. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(40):36869-72. Epub 2001/07/19.

142. Kim JJ, Choi YM, Choung SH, Yoon SH, Lee GH, Moon SY. Estrogen receptor beta gene +1730 G/A polymorphism in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility*. 2010;93(6):1942-7. Epub 2009/02/03.
143. Maguire P, Margolin S, Skoglund J, Sun XF, Gustafsson JA, Borresen-Dale AL, et al. Estrogen receptor beta (ESR2) polymorphisms in familial and sporadic breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2005;94(2):145-52. Epub 2005/11/02.
144. Sowers MR, Jannausch ML, McConnell DS, Kardia SR, Randolph JF, Jr. Endogenous estradiol and its association with estrogen receptor gene polymorphisms. *The American journal of medicine*. 2006;119(9 Suppl 1):S16-22. Epub 2006/09/05.
145. Ikeda S, Sasazuki S, Natsukawa S, Shaura K, Koizumi Y, Kasuga Y, et al. Screening of 214 single nucleotide polymorphisms in 44 candidate cancer susceptibility genes: a case-control study on gastric and colorectal cancers in the Japanese population. *The American journal of gastroenterology*. 2008;103(6):1476-87. Epub 2008/05/31.
146. Ichikawa S, Koller DL, Peacock M, Johnson ML, Lai D, Hui SL, et al. Polymorphisms in the estrogen receptor beta (ESR2) gene are associated with bone mineral density in Caucasian men and women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(11):5921-7. Epub 2005/08/25.
147. Rosenkranz K, Hinney A, Ziegler A, Hermann H, Fichter M, Mayer H, et al. Systematic mutation screening of the estrogen receptor beta gene in probands of different weight extremes: identification of several genetic variants. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1998;83(12):4524-7. Epub 1998/12/16.
148. Zulli K, Bianco B, Mafra FA, Teles JS, Christofolini DM, Barbosa CP. Polymorphism of the estrogen receptor beta gene is related to infertility and infertility-associated endometriosis. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2010;54(6):567-71. Epub 2010/09/22.
149. Christofolini DM, Vilarino FL, Mafra FA, Andre GM, Bianco B, Barbosa CP. Combination of polymorphisms in luteinizing hormone beta, estrogen receptor beta and progesterone receptor and susceptibility to infertility and endometriosis. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2011;158(2):260-4. Epub 2011/07/19.
150. Taillon-Miller P, Piernot EE, Kwok PY. Efficient approach to unique single-nucleotide polymorphism discovery. *Genome research*. 1999;9(5):499-505. Epub 1999/05/18.
151. Shen LX, Basilion JP, Stanton VP, Jr. Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(14):7871-6. Epub 1999/07/08.

Abstract

Background: Recurrent pregnancy loss (RPL) which is recognized as an important clinical problem is a multifactorial disorder as both genetic and environmental factors are involved. Conflicting data suggest an association of estrogen receptor alpha (ESR1) and estrogen receptor alpha (ESR2) gene polymorphisms with RPL.

Material and Methods: Blood samples were collected from two hundred and fifty two women with a history of three or more consecutive pregnancy losses before 20th weeks of gestation and 105 healthy women with at least two live births and no history of pregnancy losses. .Using Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), we investigated -397C/T (rs2234693) and -351A/G (rs9340799) polymorphisms on ESR1 and +1730 G / A (rs4986938), +1082G / A (rs1256049) and rs1256030 C/T polymorphisms on ESR2 gene in case and control subjects.

Results: The genotypic frequencies of -397C/T,-351A/G and +1730 G / A and rs1256030 C/T were not significantly different between RPL and control groups. In addition, there was complete linkage disequilibrium between -397C/T and -351A/G polymorphisms on ER1. The association was found between +1082G > A polymorphism on ESR2 gene and RPL.

Conclusion: This study suggests that polymorphisms in studied SNPs in the ER1 are unlikely to be associated with an increased risk of recurrent pregnancy loss in an Iranian population; however investigated polymorphisms on ESR2 gene could be associated with RPL.

Key words: ER, PR, polymorphism, RPL.